

Université de Montréal

# **Une nouvelle stratégie de traitement de la maladie cœliaque basée sur les polymères séquestrants**

par

Maud Pinier

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de Philosophæ Doctor  
en sciences pharmaceutiques  
option technologie pharmaceutique

2010

© Maud Pinier, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Une nouvelle stratégie de traitement de la maladie  
cœliaque basée sur les polymères séquestrants**

Présentée par :  
Maud Pinier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Claude Mailhot, président-rapporteur  
Jean-Christophe Leroux, directeur de recherche  
Nathalie Rivard, co-directeur  
Sylvie Marleau, membre du jury  
François Boudreau, examinateur externe  
Victor Gavino, représentant du doyen de la FES

## Résumé

La maladie cœliaque ou sprue cœliaque est une intolérance au gluten. Il s'agit d'une maladie inflammatoire de l'intestin liée à l'ingestion de gluten chez des personnes génétiquement susceptibles. Ce désordre présente une forte prévalence puisqu'il touche 1 % de la population mondiale. En l'état actuel des choses, il n'existe aucun outil pharmacologique pour traiter ou pallier à cette maladie. Cependant, grâce aux avancées dans la compréhension de sa pathogenèse, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées. À l'heure actuelle, le seul traitement efficace consiste à suspendre la consommation de l'agent pathogène, à savoir le gluten. Le gluten est un ensemble de protéines de stockage des céréales contenu dans le blé, l'orge et le seigle. Le gluten du blé se subdivise en gluténines et gliadines. Ce sont ces dernières qui semblent les plus impliquées dans la maladie cœliaque. Les gliadines et ses protéines apparentées (*i.e.* sécaldines et hordéines, respectivement dans le seigle et l'orge) sont riches en prolines et en glutamines, les rendant résistantes à la dégradation par les enzymes digestives et celles de la bordure en brosse. Les peptides résultant de cette digestion incomplète peuvent induire des réponses immunitaires acquises et innées.

L'objectif principal de cette thèse était de tester un nouveau traitement d'appoint de la maladie cœliaque utile lors de voyages ou d'évènements ponctuels. Dans les années 80, une observation italienne montra l'inhibition de certains effets induits par des gliadines digérées sur des cultures cellulaires grâce à la co-incubation en présence de mannane: un polyoside naturel composé de mannoses. Malheureusement, ce traitement n'était pas applicable *in vivo* à cause de la dégradation par les enzymes du tractus gastro-intestinaux du polymère, de par sa nature osidique. Les polymères de synthèse, grâce à la diversité et au contrôle de leurs propriétés physico-chimiques, se révèlent être une alternative attrayante à ce polymère naturel. L'objectif de cette recherche était d'obtenir un polymère liant la gliadine, capable d'interférer dans la genèse de la maladie au niveau du tube digestif, afin d'abolir les effets délétères induits par la protéine.

Tout d'abord, des copolymères de type poly (hydroxyéthylméthacrylate)-*co*-(styrène sulfonate) (P(HEMA-*co*-SS)) ont été synthétisés par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP). Une petite bibliothèque de polymères a été préparée en faisant varier la masse molaire, ainsi que les proportions de chacun des monomères. Ces polymères ont ensuite été testés quant à leur capacité de complexer la gliadine aux pH stomacal et intestinal et les meilleurs candidats ont été retenus pour des essais cellulaires. Les travaux ont permis de montrer que le copolymère P(HEMA-*co*-SS) (45:55 mol%, 40 kDa) permettait une séquestration sélective de la gliadine et qu'il abolissait les effets induits par la gliadine sur différents types cellulaires. De plus, ce composé interférait avec la digestion de la gliadine, suggérant une diminution de peptides immunogènes impliqués dans la maladie. Ce candidat a été testé *in vivo*, sur un modèle murin sensible au gluten, quant à son efficacité vis-à-vis de la gliadine pure et d'un mélange contenant du gluten avec d'autres composants alimentaires. Le P(HEMA-*co*-SS) a permis de diminuer les effets sur les paramètres de perméabilité et d'inflammation, ainsi que de moduler la réponse immunitaire engendrée par l'administration de gliadine et celle du gluten. Des études de toxicité et de biodistribution en administration aiguë et chronique ont été réalisées afin de démontrer que ce dernier était bien toléré et peu absorbé suite à son administration par la voie orale. Enfin des études sur des échantillons de tissus de patients souffrants de maladie cœliaque ont montré un bénéfice thérapeutique du polymère.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a permis de mettre en évidence le potentiel thérapeutique du P(HEMA-*co*-SS) pour prévenir les désordres liés à l'ingestion de gluten, indiquant que ce type de polymère pourrait être exploité dans un avenir proche.

**Mots-clés :** polymère séquestrant, gluten, maladie cœliaque, gliadine

## Abstract

Celiac Disease or celiac sprue is identified as a gluten intolerance. It is an inflammatory disorder of the intestine triggered by the ingestion of gluten in genetically susceptible individuals. This condition is highly prevalent because it affects up to 1% of the worldwide population. Nowadays, there is no pharmacological treatment available to treat or offset the disease. Due to the huge progress in the understanding of the pathogenesis, new therapeutic targets have been discovered. At the present time, the only effective treatment remains the strict lifelong abandonment of the pathogen agent, gluten. Gluten encompasses the storage proteins in wheat, rye and barley. The wheat gluten is divided into glutenins and gliadins. The latter seem to be the most important trigger in the celiac disease. Gliadins and the related proteins (*i.e.* secalins and hordeins, respectively in rye and barley) are rich in proline and glutamine residues, conferring them to be resistant to enzymatic digestion. The resulting peptides of the incomplete process may set off the inflammatory reaction.

The main objective of this thesis was to test a new supportive therapy in treating celiac disease, useful in particular occasions (*i.e.* during travel or social event when the gluten-free property cannot be ascertained).

In the 1980's, inhibition of some gliadin-induced effects on cell cultures were observed owing to mannose co-incubation. However, this compound, due to its osidic nature, may be cleaved by digestive enzymes *in vivo*. Synthetic polymers prove to be an attractive alternative owing to the tunability of their physical and chemical properties. The goal of this study was to obtain a polymeric gliadin-binder, interfering with the pathogenesis of the celiac disease in the gastro-intestinal tract, to abrogate the gliadin induced effects.

Atom transfer radical polymerization was used to synthesize copolymers of the type poly(hydroxyethylmethacrylate)-*co*-(styrene sulfonate) (P(HEMA-*co*-SS)). A small library of polymers varying in their molecular weight and in their constituting monomers ratio was prepared. The ability of these polymers to sequester gliadin was assessed at stomachal and intestinal pH. The best candidates were further evaluated in cell cultures. Our results

revealed that a selective binding was obtained with the P(HEMA-*co*-SS) (45:55 mol%, 40 kDa). This compound abolished gliadin-induced effects on various cell lines. In addition, gliadin digestion was hindered, suggesting a decrease in the formation of immunogenic peptides known to trigger the diseases. In *vivo* experiments were additionally carried out on a murine model of gluten-sensitivity with this polymeric candidate. Its efficacy towards pure gliadin and gluten containing food was tested. P(HEMA-*co*-SS decreased gliadin-induced effect on permeability and inflammatory parameters and modulated the immune response due to gliadin/gluten gavage. Toxicity and biodistribution studies following acute and chronic administration were performed on murine to demonstrate that the polymer was well tolerated and not absorbed after oral administration. Finally, biopsies of patients suffering from CD disease exhibited therapeutic benefit of the polymer.

Altogether, the results presented in this thesis evidenced the potential of P(HEMA-*co*-SS) to prevent the gluten-induced disorder, indicating that this type of polymer may be useful in a near future.

**Keywords :** polymeric binders, gluten, celiac disease, gliadin

## Table des matières

Chapitre 1	Introduction .....	1
1	La maladie cœliaque .....	1
1.1	Épidémiologie .....	1
1.1.1	Historique: impact des interactions entre l'homme et son environnement.....	1
1.1.2	Données épidémiologiques actuelles .....	2
1.2	La maladie cœliaque : tableau clinique.....	4
1.2.1	Historique du diagnostic clinique.....	4
1.2.2	Présentation clinique .....	4
1.3	Critères de diagnostic actuels.....	5
1.3.1	Critères histologiques actuels.....	5
1.3.2	Critères sérologiques actuels.....	6
1.4	Classification de l'atteinte cœliaque .....	8
1.5	Complications .....	9
1.5.1	Maladie cœliaque « classique ».....	9
1.5.2	Maladie cœliaque « réfractaire ».....	9
1.6	Dépistage.....	10
1.7	Pathogenèse de la maladie cœliaque .....	10
1.7.1	Composante environnementale : le point de départ avec le gluten. ....	11
1.7.2	Composante de perméabilité : l'entrée du « pathogène » .....	11
1.7.3	Composante génétique : la reconnaissance « du pathogène ».....	12
1.7.4	Composantes immunitaires : les conséquences tissulaires .....	13
1.7.4.1	Voie immunitaire acquise .....	13
1.7.4.2	Voie immunitaire innée.....	14
2	Les polymères synthétiques en tant qu'agents thérapeutiques.....	17
2.1	Polymères en tant qu'excipients de formulation.....	17
2.1.1	Utilisations des polymères en formulation.....	17

2.1.2 Exemples de formulations sur le marché et en processus d'essais cliniques.....	18
2.1.2.1 Polymères conjugués à une protéine ou à un principe actif .....	18
2.1.2.2 Polymères pour la formulation de vecteurs.....	19
2.1.2.3 Polymères pour la libération prolongée .....	21
2.2 Polymères en tant qu'agents actifs : séquestrants .....	23
2.2.1 Polymères séquestrants oraux .....	23
2.3 Applications thérapeutiques des séquestrants oraux .....	24
2.3.1 Dans l'insuffisance rénale : séquestrants d'ions .....	24
2.3.1.1 Traitement de l'hyperkaliémie .....	24
2.3.1.2 Traitement de l'hyperphosphatémie.....	25
2.3.2 Dans l'hémochromatose: séquestrants du fer.....	27
2.3.2.1 Groupements fonctionnels hydroxamates et catéchols .....	28
2.3.2.2 Groupements fonctionnels dérivés de la pyridine.....	29
2.3.3 Dans l'hypercholestérolémie : séquestrants de sels biliaires. ....	30
2.3.3.1 Groupements fonctionnels cationiques .....	30
2.3.3.2 Groupements fonctionnels anioniques et hydrophobes. ....	31
2.3.3.3 Reconnaissance par empreinte moléculaire .....	32
2.3.4 Contre l'obésité : séquestrants de lipides .....	32
2.3.5 Dans les intoxications : séquestrants de principes actifs.....	33
2.3.6 Dans les diarrhées : séquestrants de protéines toxiques.....	33
2.3.6.1 Groupements fonctionnels anioniques. ....	33
2.3.6.2 Groupements fonctionnels polysaccharidiques.....	34
2.3.6.3 Groupes fonctionnels "peptidoïdes" .....	37
2.3.7 Dans les infections : séquestrants de pathogènes bactériens.....	38
2.3.7.1 Groupements fonctionnels osidiques .....	38
2.3.7.2 Groupements fonctionnels cationiques .....	38
3 Bibliographie.....	39
4 Revue: Prevention measures and exploratory pharmacological treatments of celiac disease.....	55



4.1	Abstract .....	56
4.2	Introduction .....	56
4.3	Gluten peptides trigger celiac disease .....	58
4.4	Prevention of celiac disease .....	61
4.5	The effects of gluten-free diet .....	63
4.6	Can we “treat” celiac disease? .....	65
4.6.1	Celiac-safe wheat? .....	65
4.6.2	Exogenous enzymes can degrade gluten .....	66
4.6.3	Complexing gliadins in the gut .....	67
4.6.4	“Sealing” tight junctions .....	68
4.6.5	Interfering with immune recognition .....	69
4.6.6	Restoring immune tolerance toward gluten .....	70
4.6.7	Other avenues .....	71
4.7	Conclusion .....	74
4.8	Conflict of interest .....	74
4.9	References .....	75
5	Objectifs .....	84
Chapitre 2 Polymeric Binders Suppress Gliadin-Induced Toxicity in the Intestinal Epithelium .....		85
1	Abbreviations .....	86
2	Abstract .....	87
3	Introduction .....	88
4	Materials and Methods .....	89
4.1	Materials .....	89
4.2	Methods .....	89
4.2.1	Polymer-gliadin complexation .....	89
4.2.2	Digestion .....	90
4.2.3	Cell culture .....	90
4.2.4	Immunofluorescence microscopy .....	91
4.2.5	Cell viability assay .....	91
4.2.6	<i>In vivo</i> efficacy experiments .....	91

4.2.7	<i>In vivo</i> toxicity experiments .....	92
4.2.8	Statistical analysis .....	93
5	Results .....	93
5.1	P(HEMA- <i>co</i> -SS) binds gliadin .....	93
5.2	P(HEMA- <i>co</i> -SS) does not perturb IEC-6 cytoskeleton and morphology .....	95
5.3	P(HEMA- <i>co</i> -SS) abolishes the deleterious effect of gliadin on the cell cytoskeleton and junctional protein (ZO-1) .....	97
5.4	P(HEMA- <i>co</i> -SS) abolishes the cytotoxic effect of gliadin on PCDE .....	99
5.5	P(HEMA- <i>co</i> -SS) hinders the enzymatic hydrolysis of gliadin .....	100
5.6	P(HEMA- <i>co</i> -SS) abolishes the gliadin-induced effects on barrier function in HCD4/DQ8-mice .....	101
5.7	Increased CD3 <sup>+</sup> and F4/80 counts in gliadin-sensitive HCD4/DQ8 mice are attenuated by P(HEMA- <i>co</i> -SS).....	103
5.8	P(HEMA- <i>co</i> -SS) is safe <i>in vivo</i> when administered at high doses .....	105
6	Discussion .....	107
7	References .....	109
8	Supplementary information.....	111
8.1	Polymer synthesis .....	111
8.2	Analysis of gliadin digest.....	112
8.3	Supplementary figures .....	113
	Chapitre 3 Gluten binders exhibit therapeutic benefits in gluten-sensitive mice and in human tissues .....	120
1	Abbreviations .....	121
2	Abstract .....	122
3	Introduction .....	122
4	Results .....	124
4.1	P(HEMA- <i>co</i> -SS) decreases the formation of gluten-derived toxic peptides .....	124

4.2	P(HEMA- <i>co</i> -SS) is poorly absorbed and mainly excreted in feces .....	127
4.3	P(HEMA- <i>co</i> -SS) reduces mucosal dysfunction in gluten-sensitive mice when administered in a gluten-containing meal.....	129
4.4	P (HEMA- <i>co</i> -SS) reduces the gluten-induced mucosal and systemic immune response in gluten-sensitive mice .....	131
4.5	P(HEMA- <i>co</i> -SS) affects cytokine release by biopsies from CD patients .....	135
5	Discussion .....	137
6	Acknowledgements .....	140
7	Methods.....	141
7.1	Effect of P(HEMA- <i>co</i> -SS) on wheat gliadin, gluten and barley hordein digestion.....	141
7.2	Absorption experiments .....	143
	<i>Study design</i> - .....	143
	<i>Analytical method</i> - .....	144
7.3	<i>In vivo</i> experiments on transgenic mice .....	144
7.3.1	Effect of P(HEMA- <i>co</i> -SS) on intestinal permeability in gluten-sensitized mice .....	145
7.3.2	Effect of P(HEMA- <i>co</i> -SS) on anti-gliadin antibodies in gluten sensitized-mice .....	145
7.3.3	Effect of P(HEMA- <i>co</i> -SS) on splenocyte proliferation in gluten sensitized-mice .....	146
7.4	Effect of P(HEMA- <i>co</i> -SS) in biopsies from CD patients .....	146
7.5	Statistical analysis .....	147
8	References .....	148
9	Supplementary information.....	152
Chapitre 4. Discussion .....		160
1	Synthèse .....	160
2	Effet de la composition sur la complexation.....	162
3	Évaluation de la spécificité d'interaction du polymère.....	166

4	Évaluation du polymère à prévenir les effets induits par la gliadine sur des modèles cellulaires.....	168
5	Évaluation de la capacité du polymère à diminuer la digestion enzymatique de la gliadine, du gluten et de l'hordéine et ainsi qu'à moduler la réponse immunitaire.....	173
6	Innocuité du polymère.....	178
Chapitre 5. Conclusion et perspectives .....		181
Bibliographie des chapitres 4 et 5 .....		184

## Liste des tableaux

Tableau 1-1. Prévalence de la maladie cœliaque (A) chez la population générale, (B) dans des cohortes à risques (A) (Tableau construit à l'aide des références mentionnées) .....	3
Tableau 1-2. Récapitulatif des tests sérologiques (sensibilité et spécificité) pour la recherche des anticorps pouvant servir au diagnostic de la maladie cœliaque (Alaadini <i>et al.</i> 2005 ; Kaukinen <i>et al.</i> 2007a).....	7
Tableau 1-3. Classification des présentations cliniques et sérologiques de la maladie cœliaque (informations recueillies des revues de (Di Sabatino <i>et al.</i> 2009; Tack <i>et al.</i> 2010). .....	8
Tableau 1-4. Exemple d'amélioration de la pharmacocinétique par PEGylation chez des femmes atteintes de cancer du sein (Molineux 2003). .....	18
Tableau 1-5. Limitation de l'absorption de fer <i>in vivo</i> par un polymère fonctionnalisé à l'aide de groupements hydroxamates (Polomoscanik <i>et al.</i> 2005). .....	29
Tableau 1-6. Résumé de l'efficacité et de la récurrence des infections à <i>Clostridium difficile</i> (tolevamer versus antibiotiques). Essai clinique de phase III (Weiss 2009). Le tolevamer montre une action discrète comparativement aux antibiothérapies, mais engendre moins de récurrences. ....	34
Tableau 1-7. Pharmacological approaches to the treatment of Celiac disease .....	72
Tableau 4-1. Récapitulatif de quelques P(HEMA-co-SS) utilisés. ....	162
Tableau 4-2. Tableau récapitulatif des polymères utilisés pour l'étude de la composition sur l'efficacité de complexation de l' $\alpha$ -gliadine (Liang <i>et al.</i> 2009; Pinier <i>et al.</i> 2009; Liang <i>et al.</i> 2010). ....	163
Tableau 4-3. Tableau comparatif des deux polymères testés pour estimer l'effet de la masse molaire sur l'efficacité de complexation, à pH 6,8, ratio massique $\alpha$ -gliadine/polymère 1:2. ....	166

Tableau 4-4. Récapitulatif des protéines utilisées, point isoélectrique (pI) et complexation par le P(HEMA- <i>co</i> -SS) à pH 6,8.....	167
Tableau 4-5. Diamètre des liposomes de DMPC:chol (7:3 mol/mol) incubés en présence de PSS ou de P(HEMA- <i>co</i> -SS). ....	179
Supplementary Table 2- 1. Serum chemistry data. Healthy Balb/c mice were fed with water, PEG or polymer solutions for 22 days at an average polymer dose of 15 mg/day. Values are means of 7 mice $\pm$ SD. ....	119

## Liste des figures

Figure 1-1. Grades A, B1, et B2 de la maladie cœliaque. Images représentatives des différents grades de l'atteinte histologique dans la maladie cœliaque (Di Sabatino <i>et al.</i> 2009).	6
Figure 1-2. Mécanisme de la maladie cœliaque (Di Sabatino <i>et al.</i> 2009).	15
Figure 1-3. Structure des micelles polymères en étude clinique (NK 911) (Nakanishi <i>et al.</i> 2001).	20
Figure 1-4. Système RONDEL <sup>TM</sup> de nanoparticules en phase clinique I/II pour la libération de siARN pour le traitement de tumeurs solides (Davis 2009).	21
Figure 1-5. Concentration de testostérone (en ng/dL) dans le sang d'homme après injection d' Eligard <sup>®</sup> 22.5 (injection à Jour 0 et Jour 84)(Perez-Marrero <i>et al.</i> 2004). Un taux de testostérone bas est retrouvé durant 180 jours indiquant une castration chimique efficace.	22
Figure 1-6. Exemple de liaisons hydrogène et électrostatiques entre un ion phosphate et un groupement guanidine (Dhal <i>et al.</i> 2005).	25
Figure 1-7. Interactions électrostatiques et hydrogène entre le sevelamer et les ions phosphate (b) (Dhal <i>et al.</i> 2006).	26
Figure 1-8. Excrétion fécale de phosphore (a) et phosphore sanguin (b) en présence du dendrimère ( $p < 0.05$ )(Williams <i>et al.</i> 2009).	27
Figure 1-9. Représentation schématique de l'interaction du Fe (II) et Fe (III) avec les groupements hydroxamate (Polomoscanik <i>et al.</i> 2005).	28
Figure 1-10. Structure du dendrimère séquestrant le fer portant des dérivés hexadentate-3-hydroxypyridine-4-one (Zhou <i>et al.</i> 2006).	29
Figure 1-11. Schéma du cycle entéro-hépatique. Schéma adapté de Dowling (1973).	30
Figure 1-12. Structure du colesevelam (a) et du colestimide (b) (Dhal <i>et al.</i> 2006).	31

Figure 1-13. Schéma fonctionnel du concept de formation de complexe HuSAP et toxine (a). Schéma (b) et structure (c) du poly(acrylamide) modifié par des ligands bifonctionnels BAIT (adapté de Kitov <i>et al.</i> 2008). .....	36
Figure 1-14. Schéma de survie de souris transgéniques pour HuSAP (a et b) et biodistribution de la toxine (c) (adapté de Kitov <i>et al.</i> 2008). Survie des souris suite à l'inoculation du mélange Shiga-toxine/ polymère par la voie intra-veineuse (a) ou par inoculation dorsale de la toxine par la voie sous-cutanée puis du polymère par la voie intra-veineuse (b). Biodistribution de la <sup>125</sup> I-toxine, à 4 h, par inoculation sous-cutanée suivie de l'administration du polymère par la voie intraveineuse (c). .....	37
Figure 1-15. Structure générale des peptidoïdes (Simpson <i>et al.</i> 2009). .....	38
Figure 1- 16. The phylogeny of wheat. ....	58
Figure 1- 17. Current concept of the pathophysiology of celiac disease. ....	60
Figure 1- 18. Investigational treatments for celiac disease. ....	73
Figure 2-1. (a) Illustration of the complexation of the polymeric binder with gliadin; (b) SDS-PAGE of albumin, ovalbumin, $\alpha$ -gliadin and lysozyme (40 mg/mL) incubated with (+) or without (-) P(HEMA-co-SS) (25 kDa) (protein/polymer weight ratio of 1:2) at pH 6.8 and 37°C. $\alpha$ -Gliadin bands do not appear as dark as the other protein bands because Coomassie blue staining is less intense with this protein. (c) Selectivity of P(HEMA-co-SS) toward gliadin over various proteins using SDS-PAGE. Values are means $\pm$ SD, n=4 experiments.....	94
Figure 2-2. Effect of chelating polymer on intestinal epithelial cell cytoskeleton and morphology. IEC-6 cells were incubated for 30 min with 1 mg/mL of PEG (negative control) (i), P(HEMA-co-SS) (ii) and PSS (iii). White arrows indicate F-actin at cell-cell contacts in panels i and ii, and disruption of cell-cell contact in panel iii.....	96
Figure 2-3. Effect of gliadin complexation with P(HEMA-co-SS) on intestinal epithelial cell cytoskeleton (a) and junctional protein ZO-1	



**(b).** **a)** IEC-6 cells were incubated for 30 min with 0.5 mg/mL of BSA **(i)**, gliadin alone **(ii)** or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:1 **(iii)** and 1:2 **(iv)**. White arrows indicate cell-cell contacts in panels i, iii and iv, and a disruption of cell-cell contacts in panel ii. Data shown are representative of three different experiments. **b)** Caco-2/15 cells were incubated for 30 min with 0.5 mg/mL BSA **(i)**, gliadin alone **(ii)** or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:1 **(iii)** and 1:2 **(iv)**. Arrows in panels i, iii and iv point the ZO-1 protein. Arrows in panel ii indicate the lost of ZO-1 staining ..... 98

Figure 2-4. P(HEMA-*co*-SS) abolishes the cytotoxic effect of gliadin on primary cultures of human intestinal epithelial cells. PCDE were incubated for 48 h with 0.5 mg/mL BSA, gliadin alone or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:2, and P(HEMA-*co*-SS) alone. Mortality was quantified by the trypan blue assay. \* $p \leq 0.02$ ..... 100

Figure 2-5. HPLC traces of  $\alpha$ -gliadin after enzymatic degradation with pepsin, trypsin and chymotrypsin in the absence **(i)** or presence of P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio 1:1 **(ii)** and 1:2 **(iii)**..... 101

Figure 2-6. P(HEMA-*co*-SS) abolishes the gliadin-induced barrier dysfunction in HCD4/DQ8 mice. Controls consisted of non-sensitized mice gavaged with or without P(HEMA-*co*-SS). Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin with or without polymer (n=6-7/group). Administration of P(HEMA-*co*-SS) significantly decreased baseline ion transport **(a)** and HRP flux **(b)** compared to untreated gliadin-sensitized mice. \* $p \leq 0.02$ ..... 102

Figure 2-7. P(HEMA-*co*-SS) significantly decreased CD3<sup>+</sup> **(a)** and F4/80<sup>+</sup> cells **(b)** compared to untreated gliadin-sensitized mice. Immunohistochemistry and histogram show the number of CD3<sup>+</sup>-IEL and elongated F4/80<sup>+</sup> cells in the lamina propria: **(i)** non-sensitized mouse gavaged with rice, **(ii)** non-sensitized mouse challenged with

- P(HEMA-*co*-SS), **(iii)** gliadin-sensitized mouse challenged with gliadin **(iv)** gliadin- sensitized mouse challenged with gliadin and P(HEMA-*co*-SS). \* $p \leq 0.05$ . ..... 104
- Figure 2-8. **(a)** Weights of mice fed with water (circle), PEG (triangle) and P(HEMA-*co*-SS) (square), at an average polymer dose of 15 mg/day. Administration of P(HEMA-*co*-SS) did not change significantly the weight gain after 22 days (mean  $\pm$  SD). **(b)** Hematoxinilin and eosin stained sections of jejunum in mice which received water **(i)**, PEG **(ii)** and P(HEMA-*co*-SS) **(iii)**. ..... 106
- Figure 3-1. P(HEMA-*co*-SS) decreases the formation of peptides QLQFPQPQLPY **(A)** and PQPQLPYQPQLPYQPQPF **(B)** from wheat gluten. Digested gluten samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gluten digest in the absence of P(HEMA-*co*-SS). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.001$ . ..... 126
- Figure 3-2. P(HEMA-*co*-SS) is poorly absorbed and mainly excreted in the feces. Biodistribution and excretion profiles of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) in non-sensitized (white bars) and gluten-sensitized (black bars) HCD4-DQ8 mice after single oral dosing (240 mg/kg, 22.4  $\mu\text{Ci/kg}$ ) (n=4/group). **(a)** Cumulative dose excreted in feces, **(b)** cumulated dose excreted in urines, **(c)** blood, liver and kidney levels at sacrifice (Mean  $\pm$  SD). ..... 128
- Figure 3-3. Administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized HCD4/DQ8 mice challenged with wheat gluten mixture decreased **(A)**  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability) and **(B)** intestinal tissue conductance compared to untreated gluten-sensitized mice. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch (n=8-10); gluten mixture group: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch (n=8-10); P(HEMA-*co*-SS) (HD, high dose) + gluten mixture group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-

*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch (gluten/polymer 1:2 w/w) (n=8-10); P(HEMA-*co*-SS) (LD, low dose) + gluten mixture group (second treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch (gluten/polymer 2:1 w/w) (n=4). Mean  $\pm$  SEM, \* $p \leq 0.011$ . ..... 130

Figure 3-4. Administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized HCD4/DQ8 mice challenged with gluten-food mixture modulated mucosal **(A)** and systemic **(B)** immune responses. Gluten sensitization and gluten-food mixture challenge to HCD4/DQ8 mice increased OD levels for anti-gliadin IgA in intestinal washes. In gluten-sensitized mice, P(HEMA-*co*-SS) returned IgA levels to control values. The control group was used as reference (100% optical density at 450 nm, OD<sub>450</sub>). Mean  $\pm$  SEM, (n= 8-10/group), \* $p < 0.005$  **(A)**. Administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized mice challenged with gluten-food mixture reduced splenocyte proliferation after incubation with PT-gliadin. Data represent the stimulation index from mean [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation for triplicate cultures. Mean  $\pm$  SEM (n=8-10/ group), \* $p \leq 0.001$  **(B)**. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch; gluten mixture group: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch; P(HEMA-*co*-SS) (gluten/polymer 1:2 w/w) + gluten mixture group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch. .... 132

Figure 3-5. Modulation of cytokine production in splenocyte culture supernatants after PT-gliadin incubation: **(A)** IL-10, **(B)** TNF- $\alpha$  and **(C)** MCP-1. IL-10 secretion was increased in gluten-sensitized mice compared to controls. Administration of P(HEMA-*co*-SS) (gluten/polymer 1:2 w/w) to gluten-sensitized mice led to lower TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels in culture supernatants after PT-stimulation. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch; gluten mixture: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch;

P(HEMA-*co*-SS) + gluten mixture (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch. Mean  $\pm$  SEM (n= 8-10/group), \* $p \leq 0.01$ . In culture supernatants from the splenocytes incubated with medium alone, cytokines were below the limit of detection (LD; dotted line) ( $LD_{IL-10} = 17.5$  pg/mL;  $LD_{TNF-\alpha} = 7.3$  pg/mL;  $LD_{MCP-1} = 52.7$  pg/mL)..... 134

Figure 3-6. Incubation with P(HEMA-*co*-SS) abolished gliadin-induced TNF- $\alpha$  secretion (white bars) in culture supernatants of biopsies from CD patients. P(HEMA-*co*-SS) alone or in P-digest did not affect gliadin-induced IL-10 secretion (black bars). The negative control corresponds to biopsies incubated with medium only. Mean  $\pm$  SEM (n=4), \* $p \leq 0.05$ . BLQ: below limit of quantification ( $< 31.25$  pg/mL for IL-10 and  $< 15.62$  pg/mL for TNF- $\alpha$ )..... 136

Figure 4-1. (Rappel de la figure supplémentaire 2-1, chapitre 2) Effet du contenu en SS sur la complexation de P(HEMA-*co*-SS) à l' $\alpha$ -gliadine à pH 6,8 (■) et pH 1,2 (□). Le ratio massique  $\alpha$ -gliadine/ P(HEMA-*co*-SS) est de 1:2 (Moyenne  $\pm$  écart type, n = 3)..... 165

Figure 4-2. Cumul du  $^3[H]$ -mannitol au niveau de la face basale des cellules. La stimulation des Caco-2/15, par la gliadine (gliadine 0,5 mg/mL (●)) augmente le passage du  $^3[H]$ -mannitol vers le compartiment basal comparativement au contrôle négatif (BSA 0,5 mg/mL (■)). Les autres groupes tests (gliadine + P(HEMA-*co*-SS) 1:1 (*m/m*) (○), gliadine + P(HEMA-*co*-SS) 1:2 (*m/m*) (◆), P(HEMA-*co*-SS) 1 mg/mL (◇)) présentent des valeurs de radioactivité similaires au contrôle négatif (2 expériences, chaque puits en triplicata, moyenne  $\pm$  écart type)..... 171

Figure 4-3. Perméabilité apparente du mannitol à 180 min (2 expériences, chaque puits en triplicata, moyenne  $\pm$  écart type)..... 172

Figure 4-4. Tracé de LC-MS du gluten digéré en l'absence (i) ou en présence de P(HEMA-*co*-SS). Gluten/polymère (ratio massique) 1:1

(ii) and 2:3 (iii) (spectre pour $m/z = 1455.30-1456.30$ correspondant au peptide QLQFPQPQLPY).....	177
Supplementary Figure 2- 1. Effect of hydroxyethylmethacrylate/styrene sulfonate (HEMA/SS) ratio on gliadin complexation. $\alpha$ -Gliadin was incubated in pH 6.8 (black square) and pH 1.2 (white square) media with P(HEMA- <i>co</i> -SS) (45-65 kDa) of various SS content for 2 h ( $\alpha$ -Gliadin to P(HEMA- <i>co</i> -SS) ratio 1:2) After centrifugation, supernatants were loaded on polyacrylamide gel. Following migration, gliadin was stained with coomassie blue and quantified. Values are mean $\pm$ SD, n=3 experiments.....	113
Supplementary Figure 2-2. Effect of gliadin complexation to P(HEMA- <i>co</i> -SS) PCDE obtained by Matrisperse <sup>®</sup> treatment. PCDE were incubated for 48 h with 0.5 mg/mL BSA (i), gliadin alone (ii) or in combination with P(HEMA- <i>co</i> -SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:2 (iii). White arrows point disruption in the cell lawn. Data shown are representative of 3 different experiments.....	114
Supplementary Figure 2-3. HPLC traces of $\alpha$ -gliadin after enzymatic degradation with pepsin, trypsin and chymotrypsin in the presence of P(HEMA- <i>co</i> -SS) at a gliadin /polymer 1:2 (a) or in the absence of P(HEMA- <i>co</i> -SS) (b) and the native gliadin (c).....	115
Supplementary Figure 2-4. Complexation of gliadin with P(HEMA- <i>co</i> -SS) induces no distal epithelial dysfunction. Control mice consisted of non-sensitized mice. Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin and polymer 5 min prior gliadin gavage (n=6-7/group). No difference in baseline ion transport (a) and HRP flux (b) was found in ileal tissues from control and sensitized mice treated with P(HEMA- <i>co</i> -SS). .....	116
Supplementary Figure 2-5. Hematoxylin and eosin stained sections (i) in a non-sensitized mouse gavaged with rice, (ii) non-sensitized mouse	

gavaged with P(HEMA- <i>co</i> -SS), (iii) gliadin-sensitized mouse gavaged with gliadin, and (iv) gliadin-sensitized mouse gavaged with P(HEMA- <i>co</i> -SS) and gliadin. Gliadin sensitized mice gavaged with gliadin exhibited frequent subepithelial mononuclear infiltrates (black arrows) as well as intra-epithelial lymphocytes (red arrows). Assessment using optical microscopy revealed normal small intestinal morphology in gliadin sensitized mice that had received the polymer alone or in combination with gliadin. ....	117
Supplementary Figure 2-6. Control of the weight gain <i>in vivo</i> of HLA-DQ8 transgenic mice after 3 weeks. Control mice consisted of non-sensitized mice gavaged with or without P(HEMA- <i>co</i> -SS). Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin with or without polymer (n=6-7/group). Administration of P(HEMA- <i>co</i> -SS) did not affect significantly the weight gain within 3 weeks (mean $\pm$ SD). ....	118
Supplementary Figure 3-1. P(HEMA- <i>co</i> -SS) decreases the formation of the 13-mer peptide, LGQQQPFPPQQPY from wheat gliadin. Digested gliadin samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gliadin digest in the absence of P(HEMA- <i>co</i> -SS) (positive control). Mean $\pm$ SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, *p $\leq$ 0.001. ....	152
Supplementary Figure 3-2. P(HEMA- <i>co</i> -SS) decreases the formation of peptides YPTSPQQSGQGQQL (A), LQPQQPFPPQQPQQPFPPQ (B) and SQQQQPPF (C) from wheat gluten. Digested gluten samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gluten digest in the absence of P(HEMA- <i>co</i> -SS). Mean $\pm$ SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, *p $\leq$ 0.001.....	153

- Supplementary Figure 3-3. P(HEMA-*co*-SS) decreases the formation of peptides PQQPFPPQQPFPQQPPFW (**A**), PQQPQQPFPQPQQPFRQ (**B**), PQQPFPPQQPQQPFPQPQQPF (**C**), and LERPQQLFPQWQPLPQQPPFL (**D**) from barley hordein. Digested hordein samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the hordein digest in the absence of P(HEMA-*co*-SS) (positive control). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.005$ . ..... 154
- Supplementary Figure 3-4. P(HEMA-*co*-SS) is and mainly excreted in feces and poorly absorbed. Pharmacokinetics, excretion profiles and biodistribution of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) in Sprague Dawley rats after single oral dosing (150 mg/kg, 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ ). (**A**) Blood concentrations, (**B**) cumulative dose excreted in the feces, (**C**) cumulative dose excreted in urine, (**D**) organ distribution. Mean  $\pm$  SEM (n=7). ..... 155
- Supplementary Figure 3-5. P(HEMA-*co*-SS) is and mainly excreted in feces and poorly absorbed. Pharmacokinetics, excretion profiles and biodistribution of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) in Sprague Dawley rats, after a polymer exposure for 21 days (100 mg/kg/day) and a single dose of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (150 mg/kg, 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ ) at day 22. (**A**) Blood concentrations, (**B**) cumulative dose excreted in the feces, (**C**) cumulative dose excreted in urine, (**D**) organ distribution. Mean  $\pm$  SEM (n=7). ..... 156
- Supplementary Figure 3-6. (**A**)  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability), (**B**) intestinal tissue conductance. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch (n=8-10); gluten mixture (HL) (gluten mixture with a higher level of gluten, 4 mg) group: gluten-sensitized mice gavaged with wheat gluten (4 mg)/BSA (2 mg)/starch (2 mg) (n=5); P(HEMA-*co*-SS) + gluten mixture (HL) group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) (4 mg) and subsequently with wheat gluten (4 mg)/BSA (2 mg)/starch (2 mg) (gluten/polymer 1:1 w/w) (n=5). Mean  $\pm$  SEM \* $p \leq 0.05$ . ..... 157

Supplementary Figure 3-7. Production of TNF- $\alpha$ (white bars) and IL-10 (black bars) in culture supernatants from biopsies of CD patients after incubation with P(HEMA- <i>co</i> -SS) alone or with P-gliadin +/- P(HEMA- <i>co</i> -SS). Negative control corresponds to biopsies incubated with medium only. Mean $\pm$ SEM (n=5), *p $\leq$ 0.05. BLQ: below limit of quantification (< 31.25 pg/mL for IL-10 and < 15.62 pg/mL for TNF- $\alpha$ ). .....	158
Supplementary Figure 3-8. (A) $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability) and (B) intestinal tissue conductance in non-sensitized (n=8-10) vs. gliadin sensitized (n=5) HCD4/DQ8 mice. Mean $\pm$ SEM. ....	159



## Liste des Annexes

Annexe 1. Synthèse de l'amorceur.....	i
Annexe 2. Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome.....	ii
Annexe 3. Étude de la complexation de la gliadine.....	v
Annexe 4. Étude de perméabilité au mannitol.....	vi
Annexe 5. Étude de la déstabilisation membranaire.....	vii
Annexe 6. Contributions à la revue de littérature et aux articles scientifiques.....	viii

*À mes parents,*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir évalué cette thèse.

J'aimerais remercier Prof Leroux, mon directeur, de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire. J'avoue être venue sans trop savoir où je mettais les pieds en suivant les conseils de mes professeurs français. Au fil du temps, j'ai appris les grandes qualités scientifiques qui font la renommée du laboratoire et l'honneur qu'était de travailler sous la supervision de Jean-Christophe Leroux. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa disponibilité et sa réactivité. Je tiens aussi à le remercier pour les excellentes conditions scientifiques et matérielles dans lesquelles j'ai pu évoluer. Je suis redevable à l'autorité et à l'exigence de Jean-Christophe qui a repoussé mes limites. Ces années ont été laborieuses, mais le résultat en vaut la peine. Grand Merci.

Un grand merci au Prof. Nathalie Rivard, ma co-directrice. Merci de m'avoir intégrée à ton équipe. Le passage dans ton laboratoire a été une vraie chance dans mon PhD, tant au niveau scientifique que personnel. Merci d'avoir initié la novice que j'étais au monde la culture cellulaire. J'ai évolué dans un environnement intellectuel stimulant et convivial. Après quelques mois, j'étais émerveillée de comprendre ces acronymes barbares Cdk2, E2F4, co-IP, ZO-1 ... . J'ai énormément appris. Enfin, merci d'avoir accepté d'encadrer cette fille qui avait perdu toute confiance. Je te suis grandement redevable de la poursuite de cette « Ph.D aventure ». Tu as été à l'écoute aux moments critiques et as su me redonner confiance et motivation. Je t'adresse mes sincères remerciements.

Je souhaite adresser ma gratitude au Prof. Elena Verdu qui m'a accueilli pour 2 séjours à Mc Master où j'ai découvert un grand savoir-faire. Je te remercie pour ta disponibilité tout au long de notre collaboration.

Je vous remercie tous les trois. Votre encadrement et votre implication ont largement contribué au succès des publications. Je vous adresse mon profond respect. J'en profite pour remercier aussi les coauteurs qui ont aussi coopéré au contenu de mes travaux.

Je souhaite remercier mes « maîtres », Mohammad, Anne, Francois et Nicolas (as Nik le pic) qui m'ont initiée au monde de la chimie, de la culture cellulaire et des *in vivo*. Sans eux et leurs précieux conseils, ce projet ne serait pas ce qu'il est.

Merci aussi à Maxime, qui m'a prodigué de nombreux conseils pour l'optimisation de la synthèse et la caractérisation des polymères. Merci aussi d'avoir suivi mon parcours en évaluant les étapes importantes : mes séminaires et mon pré-doc. Je te remercie aussi de ton implication au moment des présentations orales et par affiche. Tu as contribué à améliorer la qualité des prestations.

Merci à Sukhy, Jeanne et Guillaume pour leurs corrections de ma thèse. Je remercie aussi mes parents qui ont aussi apporté leur contribution durant l'édifice de ce mémoire en tant que chasseurs de fautes !

Merci aux rats et souris...morts pour la science.

Outre le côté académique, mon Ph D a été une aventure humaine. J'ai rencontré durant mon séjour au Québec des personnes qui ont partagé cette période de ma vie.

Je pense à Anne et Marie-Christine P (MC pour les intimes !) qui m'ont prise sous leurs ailes !! Dieu sait qu'à ce moment, vous avez été une vraie bouée de sauvetage !! Une « famille québécoise » dans laquelle je me suis immergée. On a échangé nos expressions, nos recettes...J'ai découvert la tourtière et les carrés au rice krispies!!! Sans oublier les recettes de « Ricardo » avec Sim au fourneau ! Et la phrase de MC « t'es capable, lâche pas!! »

Je tiens aussi à remercier sincèrement Jeanne. J'apprécie notre complicité professionnelle comme notre complicité personnelle. Nous sommes arrivés en même temps à Montréal. Durant ces années on a partagé les angoisses, les doutes, le blues mais aussi beaucoup de moments de la vie, les bonnes nouvelles, le heureux événements, les fous rires... Toujours là pour que je puisse te demander conseil. Merci Merci.

Je remercie mes collègues des divers laboratoires Marie-Eve, Anda, Nada, Mo, Gen, Peter, MC, MH, JP, Nuria, Esra, Sukhy, Jennifer, Jane, Xianxi, Jimbo, Hugo, Gen, et Mel... Merci des moments partagés ensemble, les discussions et les précieux conseils.

Je remercie les survivors de la « secte Leroux ». Jeanne, Nik et Pierre. On était peu nombreux, nos longues discussions de « lab-meeting » étaient toujours enrichissantes. Je souhaite aussi remercier François pour son aide durant les *in vivo* et la rédaction de protocoles d'éthique ainsi que Gen, Esra et MC (J) pour les corrections d'article et de rapport. Merci aussi à tous pour les à cotés....histoire de déconnecter!

Merci aussi aux Roudoudou, à Sophie, Jeremy, Mathew, Yolaine, Jérôme, Julie, Isabelle, Vanessa et Gabrielle. Merci d'avoir été là pour permettre d'oublier les frustrations de la science !

Merci aussi à mes amis restés en Europe...malgré la distance, vous avez été là.

Je remercie aussi l'IBT et ses membres pour le refuge pour la rédaction de ma thèse. J'échappais aux bruyants travaux et je profitais de pauses « déjeuner » agréables durant ces mois studieux !

Je souhaite aussi remercier Jean et Gene ...Mes sponsors en « produits terroirs » pour les colis ... cela faisait toujours du bien !

J'adresse un grand merci à mes parents et mon frère qui m'ont soutenue dans mes choix durant toutes ces années ! J'ai toujours pu compter sur vous, vous avez toujours pris soins de moi...même par internet et téléphone ! Me voir vadrouiller n'a pas toujours été facile, mais vous avez toujours cru en moi! Je vous en remercie.

Finalement, je remercie Guillaume ! LA rencontre de mon Ph.D. En revenant de mon séjour à Sherbrooke, je t'ai trouvé installé à ma paillasse...On a partagé notre espace travail et depuis tu partages ma vie. Je te remercie de ton amour, ton soutien au quotidien malgré les 5000 km qui nous ont séparés pendant plus d'un an. Je n'aurai pu espérer meilleur compagnon. Tu as été là et tu as compris les épreuves que je traversais mieux que personne.

## Avant-propos

Afin de situer les travaux de cette thèse dans leur contexte, un chapitre d'introduction sera d'abord présenté. Une première section consistera en une description de la maladie cœliaque puis une seconde section exposera l'utilisation de polymères en thérapie humaine et portera un intérêt particulier sur les polymères comme agents thérapeutiques avec leur utilisation en tant que séquestrants oraux. Une dernière section, qui a fait l'objet d'un manuscrit de revue, sera consacrée aux diverses modalités de prévention et de traitement envisagées dans la maladie cœliaque.

Par la suite, les travaux réalisés dans cette thèse qui ont fait l'objet de deux publications seront présentés.

Le premier manuscrit (chapitre 2) consiste en une preuve de concept relative à l'intérêt des polymères séquestrants de la gliadine et son potentiel en tant que nouvelle voie thérapeutique dans le traitement de la maladie cœliaque. Le deuxième manuscrit (chapitre 3), complémentaire au premier, offre une étude plus détaillée du mécanisme d'action du polymère. Cette étude évalue l'efficacité de l'agent polymère vis-à-vis du gluten en présence d'autres composants alimentaires afin de se rapprocher davantage des conditions réelles de l'utilisation. De plus, ce manuscrit s'intéresse à l'aspect biodistribution *in vivo* avant de poursuivre avec des tests sur des tissus humains.

Les résultats de l'ensemble des travaux seront discutés au chapitre 4 avant de terminer par des conclusions générales.

## Liste complète des abréviations

*(Langue d'apparition dans le texte)*

APC: antigen presenting cells

ATRP: atom transfer radical polymerization

BSA: bovine serum albumin

CD: celiac disease

CFA: complete Freund's adjuvant

CMC : concentration micellaire critique

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CPM: count per minute

CT: cholera toxin

CXCR-3: chemokine (C-X-C motif) receptor 3

Dendrimère : structure tridimensionnelle hyperbranchée qui croît par polymérisation, par génération et de façon arborescente

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid

EATL: enteropathy-associated T-cell lymphoma

EP: endoprotease

EPR: enhanced permeability and retention

ESI: electrospray ion

FBS: fetal bovine serum

G-CFS : facteur stimulant des colonies de granulocyte

Gène CCR1 : gene chemokine c-c receptor 1

Gène CCR3 : gene chemokine c-c receptor 3

Gène ENS1: gene endonuclease subunit 1

Gène IL 2 : gene interleukin-2

Gène IL21 : gene interleukin-21

Gène ITGA4 : gene integrin- $\alpha$  4

Gène MAGI2 : gene membrane associated guanylate kinase

Gène MYO9B: gene myosin IXB

Gène PARD3: gene partitioning defective 3

Gène THEMIS : gene thymocyte-expressed molecule involved in selection.

GFD: gluten-free diet

GI: gastrointestinal

HEMA: hydroxyethylméthacrylate

HLA : human leukocyte antigen

HPMA-DOX :N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide conjugué à la doxorubicine

HRP: horseradish peroxidase

IBD: inflammatory bowel disease

IEL: intraepithelial lymphocyte

IFN- $\gamma$ : Interféron- $\gamma$

IgA AEM: Immunoglobuline A anti-endomysal

IgA AGA: Immunoglobuline A anti-gliadine

IgA AtTG : Immunoglobuline A anti-transglutaminase.

IgA DPAGA : Immunoglobuline A anti-peptides désaminés dérivés de gliadine.

IgG AEM: Immunoglobuline G anti-endomysal.

IgG AGA : Immunoglobuline G anti-gliadine

IgG AtTG : Immunoglobuline G anti-transglutaminase

IL-10: interleukin-10

Ip: intraperitoneal

Isc: short circuit current

IV: intraveineuse

LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry

Lymphocytes T CD4+: lymphocytes portant le cluster de différenciation 4 (antigène de surface).

Lymphocytes T CD8+: lymphocytes portant le cluster de différenciation 8 (antigène de surface).

MCP-1: monocytes chemotactic protein 1

MHC: major histocompatibility complex

MIC I A/B : molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I



NK : natural killer ou cellule tueuse

NKG2D : récepteur activateur des cellules « Natural Killer »

OD: optic density

P(HEMA-*co*-SS) : poly(hydroxyethylmethacrylate-*co*- styrene sulfonate)

PBS: phosphate buffer saline

PCDE: primary cultures of human differentiated enterocytes

P-digest: Peptic digest

PEG : polyéthylène glycol

PEP: prolylendopeptidase

PGA-PTX : poly(acide glutamique) couplé au paclitaxel

Protéines PEGylés ; protéines modifiées par une chaîne de polyéthylène glycol

PSS: polystyrene sulfonate

PT-digest: Peptic tryptic digest

SMANCS : poly(acide maléique-*co*-styrène) conjugué à la néocarzinostatine

SS: sulfonate de styrene

T1D: type 1 diabetes

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

tTG2 : tissue transglutaminase 2

ZO-1: zonula occludens-1

# Chapitre 1 Introduction

## 1 La maladie cœliaque

### 1.1 Épidémiologie

#### 1.1.1 Historique: impact des interactions entre l'homme et son environnement

La maladie cœliaque est une maladie chronique, multifactorielle, immunitaire et inflammatoire de l'intestin qui se développe chez des individus génétiquement susceptibles après ingestion de gluten. Cette maladie a longtemps été considérée comme une maladie européenne, mais cette croyance est erronée. L'épidémiologie actuelle de la maladie cœliaque résulte en fait de l'interaction de l'homme avec son environnement au cours de l'histoire.

L'évolution des traditions agricoles apporte des réponses sur l'histoire de la maladie. Les premières céréales cultivées, il y a 10 000 ans au niveau du croissant fertile, furent des espèces sauvages de froment (*Triticum dicocoides*) et d'orge (*Hordeum spontaneum*). Puis, les espèces ayant de bonnes propriétés élastiques pour la réalisation de la pâte à pain ont été privilégiées. Cette propriété est liée à la présence de gluten, du Latin « colle » (Greco 1997). La sélection d'espèces plus ou moins immunotoxiques pour l'homme a ainsi été engendrée depuis l'avènement de l'agriculture au néolithique. Les flux migratoires, quant à eux, expliquent la géographie actuelle de la maladie. À la recherche de plus de terres cultivables, les peuples ancestraux ont migré à partir du croissant fertile avec leur culture céréalière et se sont sédentarisés dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie du Sud et d'Amérique. Ces régions, qui représentent actuellement les foyers de la maladie, résultent donc de l'évolution des cultures céréalières ainsi que des flux migratoires au cours des siècles (*i.e.* Europe, Afrique du Nord, Asie du Sud, Amérique) (Cataldo *et al.* 2007).

### 1.1.2 Données épidémiologiques actuelles

Grâce à l'essor des tests sérologiques, des études épidémiologiques ont pu être menées et ont révélé que la maladie se développe dans les foyers de façon comparable. En effet, le blé est très présent dans la nourriture de tous les peuples sédentarisés qui descendent des migrants du croissant fertile.

La prévalence mondiale de la maladie est estimée à 1 % (Dube *et al.* 2005; Van Heel *et al.* 2006) dans la population générale et augmente jusqu'à 33 % chez les populations dites « à risque » (Tableau 1-1). Le peuple Sahawari reste une particularité, car 5,6 % de la population est atteinte de la maladie cœliaque, le plus haut taux au monde connu (Catassi *et al.* 2001). Une forte consanguinité, la diminution de l'allaitement maternel et l'introduction rapide de blé expliqueraient cette forte prévalence.

Tableau 1-1. Prévalence de la maladie cœliaque (A) chez la population générale, (B) dans des cohortes à risques.

(A) (Tableau construit à l'aide des références mentionnées)

Pays	Test de détection durant l'étude	Échantillon	Prévalence	Année	Référence
<b>Amérique</b>	IgA et IgG AGA et IgA AEM, IgA AtTG, génotypage HLA	Population générale	1:133	2003	(Fasano <i>et al.</i> 2003)
<b>Argentine</b>	IgA AEM, IgA et IgG AGA	Population générale	1:167	2001	(Gomez <i>et al.</i> 2001)
<b>Brésil</b>	IgA A AtTG	Population générale	1:214	2007	(Oliveira <i>et al.</i> 2007)
<b>Égypte</b>	IgA et IgG A AtTG, IgA AEM	Enfants	1:187	2008	(Abu-Zekry <i>et al.</i> 2008)
<b>Estonie</b>	IgA A AtTG	Enfants scolarisés	1:288	2006	(Ress <i>et al.</i> 2006)
<b>Finlande</b>	IgA AEM, IgA AtTG	Enfants scolarisés	1:99	2003	(Maki <i>et al.</i> 2003)
<b>Inde du Nord</b>	IgA AtTG	Enfants	1:100	2009	(Bhattacharya <i>et al.</i> 2009)
<b>Iran</b>	IgA AGA, IgA AEM	Population générale	1:166	2003	(Shahbazkhani <i>et al.</i> 2003)
<b>Islande</b>	IgA AtTG	Population générale	1:136	2009	(Johannsson <i>et al.</i> 2009)
<b>Portugal</b>	IgA AEM, IgA AtTG	Adolescents	1:134	2006	(Antunes <i>et al.</i> 2006)
<b>Royaume -uni</b>	IgA AtTG, IgA AEM IgA AEM	Enfants scolarisés	1:100	2004	(Bingley <i>et al.</i> 2004)
		Adultes	1:100	2003	(West <i>et al.</i> 2003)
<b>Suisse</b>	IgA AEM, IgA AtTG, IgA et IgG AGA	Adolescents	1:132	2002	(Rutz <i>et al.</i> 2002)
<b>Syrie</b>		Population générale	1:150	2004	(Challar <i>et al.</i> 2004)
<b>Tunisie</b>	IgA AEM, IgA AtTG	enfants scolarisés	1:157	2007	(Ben Hariz <i>et al.</i> 2007)
<b>Turquie</b>	IgA AtTG	Enfants scolarisés	1:115	2005	(Ertekin <i>et al.</i> 2005)

(B)

Pays	Étude	Échantillon	Prévalence	Année	Référence
<b>Amérique</b>	IgA et IgG AGA et IgA AEM, IgA AtTG, génotypage HLA	Famille au 1 <sup>er</sup> degré*	1:22	2003	(Fasano <i>et al.</i> 2003)
		Famille au 2 <sup>nd</sup> degré**	1:39		
<b>Inde du Nord</b>	IgA AtTG	Famille au 1 <sup>er</sup> degré*	1:12	2007	(Grover <i>et al.</i> 2007)
<b>Italie</b>	IgA AEM, IgA AtTG, génotypage HLA	Famille au 1 <sup>er</sup> degré*	Jusqu'à 1:3	2007	(Bourgey <i>et al.</i> 2007)
<b>Suède</b>	IgA et IgG AtTG	Enfants nés en 1993	3:100	2009	(Myleus <i>et al.</i> 2009)

IgA AGA : Immunoglobuline A anti-gliadine ; IgG AGA: Immunoglobuline G anti-gliadine ; IgA AtTG : Immunoglobuline A anti-transglutaminase ; IgG AtTG: Immunoglobuline G anti-transglutaminase; IgA AEM: Immunoglobuline A anti-endomysal ; IgG AEM: Immunoglobuline G anti-endomysal. \* la famille au 1<sup>er</sup> degré d'une personne atteinte de la maladie cœliaque (parents, fratrie, descendance); \*\* la famille au 2<sup>nd</sup> degré d'une personne atteinte de la maladie cœliaque (grands-parents, petits enfants, oncle/tante, neveu/niece et demi-frère/sœur)

## 1.2 La maladie cœliaque : tableau clinique

### 1.2.1 Historique du diagnostic clinique

Areataeus le Cappadocien, au II<sup>ème</sup> siècle après Jésus Christ, fit la première description clinique de la maladie, décrivant diarrhée et asthénie (traduction de ses écrits par F. Adams en 1856) (Ciclitira *et al.* 2005). Il est à l'origine du terme « maladie cœliaque », du grec « kœaliakos » qui souffre de l'intestin. À la fin du XIX<sup>ème</sup> et au tout début du XX<sup>ème</sup> siècle, Gee et Herter, des pédiatres anglais et américain, respectivement, ont de nouveau décrit cette maladie, en ajoutant une malnutrition et des retards de croissance au tableau clinique d'Areataeus. Toutefois, ce n'est que lors de la Seconde Guerre Mondiale que l'agent responsable de la maladie a été mis en lumière. Un pédiatre hollandais, W. Dicke, remarqua une amélioration de l'état de certains enfants durant le rationnement lié à la guerre puis une détérioration après la période de pénurie (Dicke *et al.* 1953). Il a ainsi établi le lien entre la consommation de céréales, notamment le blé et son effet délétère sur la santé de certains enfants (Ciclitira *et al.* 2005 ; Cataldo *et al.* 2007). Plus tard, W. Dicke et son équipe ont mis en évidence l'agent toxique : la farine de blé (Van De Kamer *et al.* 1953). Ce n'est qu'en 1954 que Paulley réalisa la première description précise des lésions intestinales (Ciclitira *et al.* 2005).

### 1.2.2 Présentation clinique

La maladie cœliaque se manifeste cliniquement de façon inconstante et variable, il est donc peu aisé de définir un tableau symptomatique typique. Il existe une grande variété de symptômes et des manifestations extra-intestinales (Green *et al.* 2007). Il ne s'agit pas seulement d'une maladie intestinale, mais bien d'une maladie multi-systèmes (Sollid 2002 ; Murray *et al.* 2003). De plus, les patients peuvent être asymptomatiques ou présenter un tableau clinique sévère. À cela s'ajoutent des variations d'expressions cliniques selon le stade de la vie des patients.

Chez le jeune enfant, les symptômes apparaissent d'autant plus tôt que l'introduction des céréales est précoce. Le diagnostic est donc posé avant 2 ans, suite à une cassure dans

l'évolution staturo-pondérale de l'enfant, associée à des symptômes digestifs (*i.e.* vomissements, douleurs abdominales). Parfois, les symptômes sont plus ténus, dans ce cas, les bilans sérologiques aident au diagnostic.

Chez l'adolescent et l'adulte, le diagnostic est plus difficile pour le praticien, car la symptomatologie digestive est très variable (*e.g.* diarrhée, constipation, vomissements, flatulences, douleurs) et parfois mal interprétée (*i.e.* syndrome de malabsorption, diarrhée tropicale ou intolérance au lait de vache). À cela s'ajoutent possiblement des symptômes extra-intestinaux apparemment non reliés (*i.e.* retard pubertaire chez l'adolescent, anémie, asthénie, atteintes osseuses et dentaires, atteintes cutanéomuqueuses, troubles endocriniens, neuropathies, troubles de la fertilité, ménopause précoce) (Malamut *et al.* 2009b). Les patients présentent aussi fréquemment des troubles de l'humeur comme l'irritabilité ou la dépression. Généralement, l'accumulation de ces facteurs permet de suspecter la maladie cœliaque.

### **1.3 Critères de diagnostic actuels**

Les premiers critères de diagnostic ont été établis en 1969. La maladie cœliaque se définissait alors selon 3 caractéristiques : i) une muqueuse anormale sous diète normogluténique, ii) une amélioration des tissus, suite au retrait du gluten de l'alimentation du patient et iii) une détérioration lors de la réintroduction. Grâce à l'avancement des connaissances sur la maladie et sur les techniques, les critères du diagnostic ont été modifiés.

#### **1.3.1 Critères histologiques actuels**

Selon les critères fixés en 1990 (Walkersmith *et al.* 1990), le diagnostic de la maladie cœliaque est posé suite à l'observation de lésions intestinales inflammatoires, d'une part, et à une réponse positive à la diète sans gluten, d'autre part.

Lors de la phase pathologique inflammatoire, on observe une infiltration lymphocytaire, une atrophie des villosités et une hyperplasie cryptale. Ces lésions histologiques sont retrouvées au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle. Elles sont souvent

discontinues et justifient la répétition des biopsies. Selon une étude récente, 3 biopsies suffiraient pour confirmer le diagnostic (Pais *et al.* 2007), mais la règle standard reste la réalisation de 4 biopsies. Une forte suspicion est évoquée suite à des biopsies anormales, classifiées en 3 stades (A, B et B2, classification de *Corraza et al.* (Figure 1-1)) selon l'atteinte histologique (Di Sabatino *et al.* 2009). Le diagnostic de certitude est posé lorsque, suite à une diète sans gluten, on observe une amélioration de l'état de la muqueuse. Après cette confirmation, on décide de l'instauration d'un régime sans gluten.

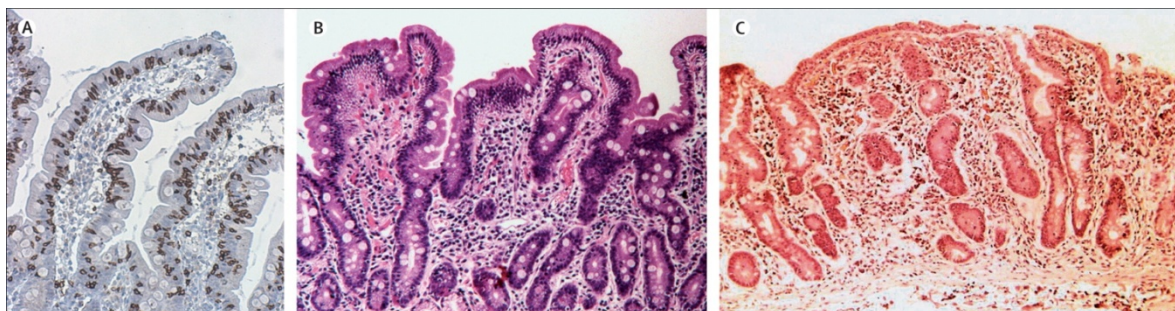


Figure 1-1. Grades A, B1, et B2 de la maladie cœliaque. Images représentatives des différents grades de l'atteinte histologique dans la maladie cœliaque (Di Sabatino *et al.* 2009).

(A) Grade A (infiltration sans atrophie villositaire, coloration hématoxyline/éosine (H&E), et marquage du CD3). (B) Grade B1 (atrophie villositaire, les villosités sont raccourcies, mais détectables). (C) Grade B2 (atrophie, les villosités ne sont plus détectables, coloration H&E)

### 1.3.2 Critères sérologiques actuels

Hormis l'histologie, qui reste le test faisant autorité pour le diagnostic de la maladie cœliaque, des analyses sérologiques permettent d'étayer le diagnostic suite à des symptômes cliniques évocateurs (Tableau 1-2).

Les tests sérologiques permettent d'objectiver et clarifier l'atteinte des patients. Les tests les plus recommandés sont les recherches d'anticorps anti-transglutaminases (IgA AtTG) et IgA anti-endomysal (IgA AEM) grâce à leurs fortes spécificité et sensibilité plutôt que la recherche d'IgA anti-gliadine (IgA AGA). Cependant, certains patients souffrent d'une déficience en IgA, les tests de recherche d'IgG restent alors un recours intéressant. Hopper *et al.* recommandent les IgA AtTG en sérologie de première intention, mais reconnaissent

l'importance de la biopsie lors d'une forte suspicion malgré une sérologie négative (Hopper *et al.* 2008).

Kaukinen *et al.* ont développé un test de recherche d'anticorps anti-peptides désaminés dérivés de gliadine (IgA DPAGA) qui s'est révélé être plus sensible et plus spécifique que la recherche des IgA AGA (Kaukinen *et al.* 2007b). Cet outil pourrait s'avérer utile dans le diagnostic, d'autant plus que les résultats semblent corrélés avec le degré d'atrophie villositaire (Rashtak *et al.* 2008).

Tableau 1-2. Récapitulatif des tests sérologiques (sensibilité et spécificité) pour la recherche des anticorps pouvant servir au diagnostic de la maladie cœliaque (Alaedini *et al.* 2005 ; Kaukinen *et al.* 2007a).

Test pour la recherche des anticorps suivant	Sensibilité* du test sérologique ELISA	Spécificité** du test sérologique ELISA
<b>IgA AEM</b> <b>IgA AtTG</b>	> 90 %	> 95 %
<b>IgA AGA</b>	~ 80 %	~ 80-90 %
<b>IgG AEM</b> <b>IgG AtTG</b>	~ 40 %	> 95 %
<b>IgG AGA</b>	~ 80 %	~ 80 %
<b>IgA DPAGA</b>	91 %	98 %

IgA AEM: Immunoglobuline A anti-endomysal; IgA AtTG : Immunoglobuline A anti-transglutaminase; IgA AGA: Immunoglobuline A anti-gliadine; IgG AEM: Immunoglobuline G anti-endomysal; IgG AtTG : Immunoglobuline G anti-transglutaminase; IgG AGA : Immunoglobuline G anti-gliadine; IgA DPAGA : Immunoglobuline A anti-peptides désaminés dérivés de gliadine.

\*Sensibilité = capacité du test donner un résultat positif pour une personne atteinte de la maladie.

\*\*Spécificité= capacité du test à donner un résultat négatif pour une personne saine, soit le pourcentage de « vrais négatifs ».

Cependant, avec les critères actuels de diagnostic, une sérologie positive ne permet pas de poser un diagnostic et une biopsie reste nécessaire. En cas de biopsies négatives et de sérologies positives, il y a forte suspicion de maladie cœliaque. En effet, une biopsie peut se révéler faussement négative, de par la nature discontinue des lésions (Alaedini *et al.* 2005). Dans ce cas, on peut effectuer un génotypage HLA des patients suspectés coeliaques.



Cependant, ce test ne permet pas le diagnostic. Il permet d'éliminer la maladie si la personne ne fait pas partie de la population à risque.

## 1.4 Classification de l'atteinte cœliaque

La maladie cœliaque se divise en 3 sous-groupes selon l'atteinte et la sérologie des patients (Tableau 1-3). On parle de maladie cœliaque majeure, mineure ou silencieuse.

La maladie cœliaque majeure est communément caractérisée par des diarrhées, des ballonnements, une malabsorption et une asthénie générale (Green *et al.* 2003). Dans ce cas, la biopsie révèle des lésions typiques inflammatoires. La forme mineure, quant à elle, correspond à une atteinte légère de la muqueuse et à des symptômes atypiques associés à une sérologie positive (Di Sabatino *et al.* 2009). La forme silencieuse, enfin, est caractérisée par l'absence de symptômes accompagnée d'une sérologie positive chez une personne apparentée à un malade (Di Sabatino *et al.* 2009).

Tableau 1-3. Classification des présentations cliniques et sérologiques de la maladie cœliaque (informations recueillies des revues de Di Sabatino *et al.* 2009 ; Tack *et al.* 2010).

Classification	Clinique	Diagnostic	Remarque
<b>Atteinte silencieuse</b>	Aucun symptôme	IgA AEM ou AtTG positif	Parenté d'un malade diagnostiqué cœliaque. Biopsie légèrement anormale
<b>Atteinte mineure</b>	Quelques symptômes disparates ou symptômes d'une maladie auto-immune associée	IgA AEM ou Anti-tTG positif	Confirmation des sérologies par une biopsie positive
<b>Atteinte majeure</b>	Tableau clinique clair ( <i>e. g.</i> malabsorption, diarrhée, perte de poids)	Biopsie positive suite au bilan clinique	

IgA AEM: Immunoglobuline A anti-endomysal; IgA AtTG : Immunoglobuline A anti-transglutaminase.

## 1.5 Complications

### 1.5.1 Maladie cœliaque « classique »

Des complications peuvent être associées à la maladie cœliaque comme l'ostéoporose, reliée à la malabsorption (Jabri *et al.* 2006). On observe aussi la concomitance d'autres maladies auto-immunitaires comme le diabète de type I (5-10% des patients) (Alaedini *et al.* 2005). Le risque de décès relié à la maladie cœliaque est augmenté au cours de la première année de suivi (multiplié par 2,8) puis ce risque diminue. Le risque global de décès pour une personne souffrant de maladie cœliaque est augmenté de 39% comparé à la population générale (Ludvigsson *et al.* 2009).

Le risque de cancer, tout type confondu, est multiplié par 1,3 (Askling *et al.* 2002; Peters *et al.* 2003) chez les patients atteints, comparé à la population générale. Pour le cas particulier des lymphomes non hodgkiniens, le risque est multiplié par 4 (Ying *et al.* 2009).

La diète sans gluten permet d'une part une régression des symptômes, d'autre part la prévention des complications osseuses (Bai *et al.* 1997; Mora *et al.* 1999), auto-immunes (Cosnes *et al.* 2008), voire malignes (Haines *et al.* 2008). Globalement, l'assiduité à la diète sans gluten semble être corrélée à une diminution de la mortalité des patients (Corrao *et al.* 2001). Plus récemment, il a été rapporté une possible influence de la dose de gluten ingéré avant le diagnostic sur la mortalité (Biagi *et al.* 2010).

### 1.5.2 Maladie cœliaque « réfractaire »

Cinq cas sur cent ne répondent pas histologiquement ni cliniquement à la diète sans gluten (Rubio-Tapia *et al.* 2009). On parle alors de maladie cœliaque réfractaire qui peut aussi être associée à des complications de type inflammatoire comme la colite ulcéreuse (10% des cas de maladie cœliaque réfractaire) (Ciclitira *et al.* 2005). Les patients peuvent souffrir de maladie cœliaque réfractaire de type I, en l'absence de population de lymphocytes T CD8+ anormale, ou de type II, en présence de population de lymphocytes T CD8+ anormale. Le pronostic vital est alors peu favorable. La survie globale à 5 ans des malades souffrant de maladie cœliaque réfractaire est de 70% (Rubio-Tapia *et al.* 2009) ou

plus particulièrement de 93% pour un type I et de 44% pour un type II (Malamut *et al.* 2009a).

## 1.6 Dépistage

Certaines complications liées à la maladie cœliaque peuvent être importantes, comme exposées précédemment et pourraient être prévenues grâce à la diète sans gluten. Des études révèlent que la maladie cœliaque est sous-diagnostiquée : pour une personne diagnostiquée, il y aurait 7 à 8 malades « qui s'ignorent » (Fasano *et al.* 2001 ; Van Heel *et al.* 2006 ; Ravikumara *et al.* 2007).

Étant donné que des outils de détection existent, la question d'un dépistage est donc récurrente. Selon les critères de l'OMS, un dépistage pourrait être préconisé, car i) la maladie est fréquente, ii) la morbidité est significative et les complications peuvent être sévères, iii) il existe des marqueurs spécifiques et sensibles et iv) des mesures peuvent être prises suite au diagnostic.

Les tests sérologiques existants pourraient être utilisés. Des tests de génotypage anténataux pourraient être effectués chez la population à risque (Bourgey *et al.* 2007 ; Megiorni *et al.* 2009). Des tests simples de recherche de IgA AtTG par prélèvements salivaires (Ocmant *et al.* 2007) ou par ponction sanguine au niveau du doigt (Korponay-Szabo *et al.* 2007) sont aussi à l'étude pour un dépistage de masse.

Mais faut-il faire un dépistage dans la population générale ou dans une cohorte « à risque » ? Cette question reste au cœur des débats, car il y a un coût pour mettre en œuvre une campagne de dépistage et il doit être mis en équation avec le bénéfice sur la mortalité (Di Sabatino *et al.* 2009).

## 1.7 Pathogenèse de la maladie cœliaque

Depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle, la maladie cœliaque a été largement étudiée et sa pathogenèse de mieux en mieux comprise, même si des zones d'ombres subsistent. Des composantes ont été clairement identifiées, à savoir i) le gluten et les protéines de stockage

des céréales apparentées, ii) la susceptibilité génétique, iii) la perméabilité intestinale et iv) la réaction immunitaire et inflammatoire (Figure 1-2). D'autres cofacteurs sont aussi en cause, comme l'allaitement au biberon, les épisodes de gastroentérites virales chez le nourrisson ou la flore intestinale. Ces derniers seront exposés dans la revue de littérature qui fait l'objet de la dernière section de l'introduction.

### **1.7.1 Composante environnementale : le point de départ avec le gluten.**

Le blé, ou plus précisément, le gluten, un ensemble de protéines de stockage, est le déclencheur de la cascade réactionnelle. Le gluten se subdivise en 2 groupes, les prolamines (solubles dans l'éthanol) et les gluténines (solubles dans l'eau et les solutions salines). Les prolamines du blé sont les gliadines. Pour les céréales apparentées, il s'agit des hordéines et des sécalines, respectivement pour l'orge et le seigle (Vader *et al.* 2003a).

Les gliadines se subdivisent en groupes ( $\alpha$ ,  $\gamma/\beta$  et  $\omega$ ) selon leur séquence. À cause de leur richesse en proline (15 %) et en glutamine (35 %), ces protéines sont résistantes aux conditions rigoureuses du tube digestif et difficilement clivables par les enzymes digestives et celles de la bordure en brosse. Les peptides de digestion résultants sont les instigateurs majeurs de la pathologie. Certains composants ont été clairement incriminés: les gluténines de haute masse molaire (Dewar *et al.* 2006) et l' $\alpha$ -gliadine, avec plus particulièrement le peptide immunodominant, 33-mer, p57-89 (Shan *et al.* 2002) et le peptide non-immunodominant, 13-mer, p31-43 (Di Sabatino *et al.* 2006).

### **1.7.2 Composante de perméabilité : l'entrée du « pathogène »**

Le passage de la lumière de l'intestin vers la *lamina propria* est une étape décisive dans le développement de la maladie. En conditions normales, les antigènes sont absorbés au travers de la muqueuse (*i.e.* du pôle apical vers le pôle basal des entérocytes) par transcytose (Fasano 2001). Schumann *et al.* ont mis en lumière le mécanisme de transcytose du peptide 33-mer de l' $\alpha_2$ -gliadine mettant en jeu l'endocytose par la voie des clathrines (Schumann *et al.* 2008). Matsiak-Budnik *et al.* ont montré le passage des peptides 13-mer et 33-mer vers la *lamina propria* par un mécanisme de rétrotranscytose *via*

un récepteur à la transferrine (Matysiak-Budnik *et al.* 2008). A la différence de la transcytose, la rétrotranscytose est un transport protégé des peptides de la gliadine. En effet, ces derniers sont couplés à des immunoglobulines A (IgA). Le transport s'effectue grâce à la reconnaissance des IgA par la transferrine (Matysiak-Budnik *et al.* 2008).

Il a aussi été montré qu'en présence de gliadine, les entérocytes, *via* CXCR-3 (chemokine (C-X-C motif) receptor 3) (Lammers *et al.* 2008) et MyD88 (Thomas *et al.* 2006), sécrètent la zonuline, une protéine analogue de la toxine du choléra. Cette protéine déclenche une cascade de phosphorylations qui aboutit à une dérégulation des jonctions serrées. Par conséquent, un passage anormal des macromolécules serait aussi favorisé par voie paracellulaire.

### **1.7.3 Composante génétique : la reconnaissance « du pathogène »**

La forte prévalence familiale (Corazza *et al.* 1992), fraterne et gémellaire (Greco *et al.* 2002 ; Nistico *et al.* 2006) souligne l'importance de la prédisposition génétique des individus (Hoffenberg 2005 ; Armstrong *et al.* 2009 ). La contribution des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II) HLA (Human Leukocyte Antigen)-DQ2 et DQ8 sur les cellules présentatrices d'antigènes est bien établie depuis les années 90, puisque plus de 90-95 % des personnes atteintes de la maladie cœliaque expriment DQ2 et le reste des patients expriment DQ8 (Sollid 2000). De plus, il existe une relation dose/effet entre les gènes et la maladie cœliaque. D'une part, les personnes homozygotes HLA DQB 1\*02 ont un risque multiplié par 5 de souffrir de la maladie cœliaque (Murray *et al.* 2007). D'autre part, l'homozygotie est reliée à la sévérité de l'expression clinique de la maladie (Vader *et al.* 2003b; Nenna *et al.* 2008).

Cependant, la génétique du système HLA n'expliquerait qu'une partie du risque héréditaire (Sollid *et al.* 2005). En effet, la prévalence mondiale de la maladie est estimée à 1 % (Dube *et al.* 2005; Van Heel *et al.* 2006) tandis que 30-35 % de la population (Dewar *et al.* 2004) sont porteurs de ces molécules du CMH II. Étant donné que les jumeaux homozygotes ont une concordance plus grande que les hétérozygotes (Nistico *et al.* 2006), d'autres gènes, hors HLA, semblent avoir aussi un rôle dans la pathogenèse comme des gènes impliqués

dans les fonctions de la barrière épithéliale (gène MYO9B (myosin IXB) (Monsuur *et al.* 2005), gène PARD3 (partitioning defective 3) , gène MAGI2 (membrane associated guanylate kinase) (Wapenaar *et al.* 2008)) ou encore des gènes, codant pour des intégrines, des cytokines et leurs récepteurs, des protéines de signalisation impliquées dans le contrôle de la réponse immunitaire innée (gène ITGA4 (integrin  $\alpha$  4) (Garner *et al.* 2009), gène IL (interleukine) 2, gène IL21, gène CCR3 (chemokine c-c receptor 3), gène CCR1(chemokine c-c receptor 1) (Hunt *et al.* 2008)) ou de la réponse immunitaire acquise (gène ENS1(endonuclease subunit 1), gène THEMIS (thymocyte-expressed molecule involved in selection) (Dubois *et al.* 2010).

#### **1.7.4 Composantes immunitaires : les conséquences tissulaires**

Les peptides ayant accédé aux tissus subépithéliaux peuvent interagir avec les cellules immunitaires. Dans l'état actuel des connaissances, le mécanisme de la maladie se compose de deux voies : une liée aux lymphocytes T ou immunité acquise et l'autre liée à l'interleukine 15 (IL-15) mettant en jeu l'immunité innée.

##### *1.7.4.1 Voie immunitaire acquise*

Le peptide 57-89 active les lymphocytes T CD4+ grâce aux cellules présentatrices d'antigènes *via* les molécules du CMH II, HLA-DQ2/DQ8 (Shan *et al.* 2002). Ces molécules ont un rôle pivot puisqu'elles reconnaissent le pathogène, le 33-mer, et activent la cascade inflammatoire. Elles sont le lien entre le déclencheur environnemental et la réponse immunitaire et inflammatoire (Figure 1-2).

La toxicité du peptide 33-mer est d'autant plus grande si celui-ci subit une réaction de désamination par les transglutaminases tissulaires de type 2 (Maiuri *et al.* 2003; Shan *et al.* 2005). Cette réaction entraîne l'apparition de charges négatives en transformant une glutamine en glutamate. L'apparition d'une charge permet une plus grande affinité avec HLA-DQ2 et l'apparition de deux charges facilite l'ancrage avec le HLA-DQ8. Ceci explique peut être la pénétrance moindre de la maladie chez les personnes HLA-DQ8 (Henderson *et al.* 2007). Suite à l'activation des lymphocytes T CD4+, il se produit une libération de cytokines inflammatoires dont l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) entraînant une

inflammation. L'IFN- $\gamma$  entraîne l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose en induisant l'expression des récepteurs transmembranaires, les récepteurs Fas, à la surface des entérocytes. La lyse cellulaire par les lymphocytes cytotoxiques (CD8+) porteurs du ligand-Fas, une autre protéine transmembranaire, est donc favorisée. L'IFN- $\gamma$  stimule aussi la libération de métalloprotéases par les fibroblastes qui détruisent la lame basale (Di Sabatino *et al.* 2009).

De façon parallèle à cette réponse immunitaire adaptative, il se produit une activation de lymphocytes B. Des anticorps anti-gliadines et des auto-anticorps anti-transglutaminases tissulaires sont sécrétés. En effet, de par leur fonction, les transglutaminases tissulaires peuvent se lier aux peptides et former des « super antigènes ». Ces « complexes enzyme/peptides » sont responsables de la sécrétion des auto-anticorps anti-transglutaminases tissulaires par les lymphocytes B (Di Sabatino *et al.* 2009).

#### 1.7.4.2 Voie immunitaire innée

Il a été démontré que le peptide non-immunodominant p31-43 induit la sécrétion d'IL-15 par les entérocytes (Maiuri *et al.* 2003). Cette cytokine entraîne l'apparition des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, MIC I A/B, reconnues par le récepteur NKG2D (un récepteur activateur des cellules « Natural Killer ») (Hue *et al.* 2004 ; Meresse *et al.* 2004) et est responsable du recrutement des lymphocytes au niveau de l'épithélium (CD8+ et NK (« natural killer » ou cellule tueuse) (Gianfrani *et al.* 2003) (Figure 1-2). L'activation de ces derniers entraîne une destruction de l'épithélium grâce au système perforine/granzyme (Hue *et al.* 2004; Meresse *et al.* 2004; Jabri *et al.* 2006; Craig *et al.* 2007).

Ces phénomènes immunitaires, supérieurs au niveau basal, provoquent une cascade inflammatoire qui génère les dommages tissulaires caractéristiques de la maladie (*i.e.* atrophie villositaire et infiltration lymphocytaire).

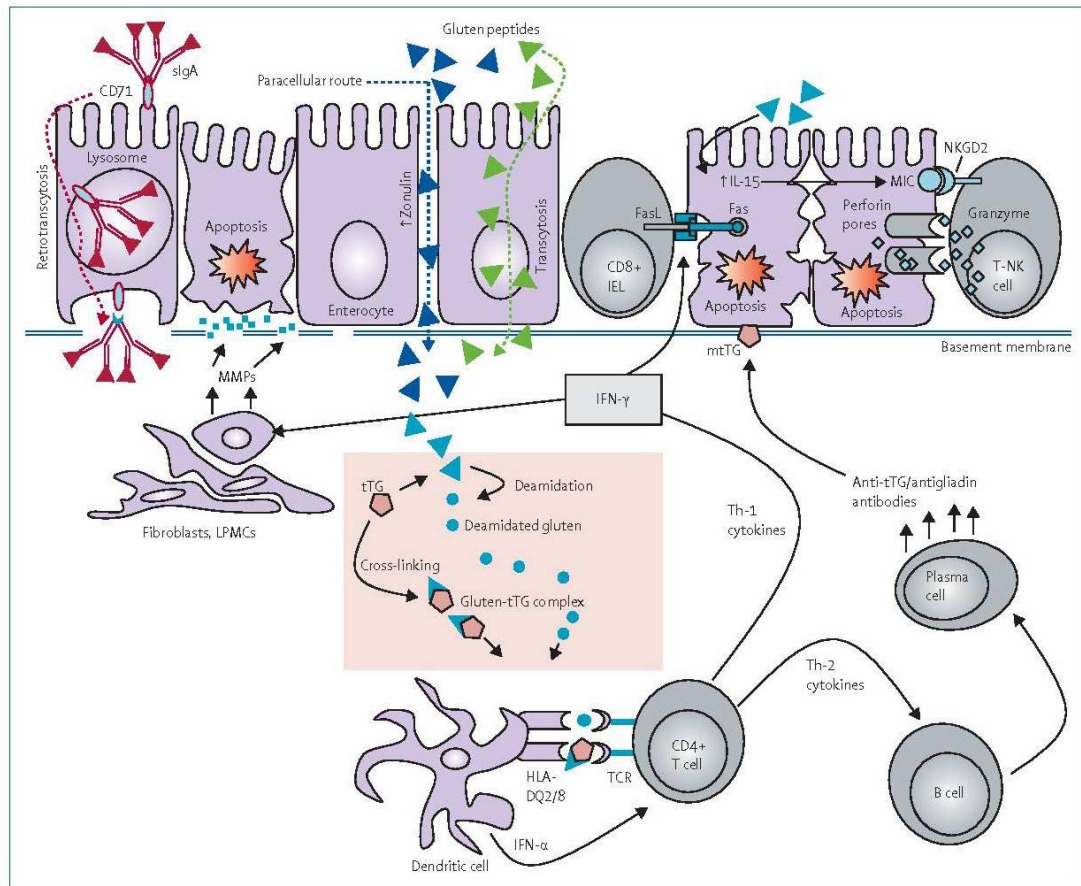


Figure 1-2. Mécanisme de la maladie cœliaque (Di Sabatino *et al.* 2009).

Les peptides dérivés du gluten sont transportés vers la *lamina propria* par la voie de rétrotranscytose avec de l'IgA (rouge), la voie transcellulaire (verte) ou la voie paracellulaire (bleu). Cette dernière voie est liée à une altération de l'intégrité des fonctions épithéliales (dommages tissulaires, libération de zonuline). Les peptides sont ensuite présentés aux lymphocytes T CD4+ *via* les molécules du CMH II, à savoir HLA-DQ2/8 présentes sur les macrophages. L'affinité pour ces molécules est augmentée suite à l'action des transglutaminase tissulaires. Ces enzymes sont activées uniquement après des dommages tissulaires (Siegel *et al.* 2008). Les lymphocytes T CD4+ activés produisent des cytokines Th1 notamment de l'INF- $\gamma$ . Cette sécrétion induit la stimulation de fibroblastes et des cellules mononuclées de la *lamina propria* qui vont sécréter des métalloprotéases entraînant la dégradation de la lame basale. L'INF- $\gamma$  augmente la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+ intra-épithéliaux ainsi que celle des cellules T natural killer (NK). Les lymphocytes T CD8+ intra épithéliaux engendrent l'apoptose par activation de la voie Fas/FasL et les cellules T natural killer par l'activation de la voie perforine/granzyme. Cette dernière est précédée d'une reconnaissance MICA1/NKG2D, l'expression de MICA étant induite par l'IL-15. En parallèle, les lymphocytes T CD4+ stimulent les lymphocytes B. Il en résulte une expansion clonale et une différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps notamment anti-gliadine et anti-transglutaminases tissulaires.



En résumé, la maladie cœliaque est un problème de santé mondiale pour lequel aucun traitement n'existe hormis l'éviction du pathogène, le gluten. Le développement de cette maladie suit un mécanisme complexe. La compréhension du mécanisme et l'identification des acteurs restent incomplètes. Néanmoins, grâce aux avancées dans la compréhension du mécanisme réactionnel, de nouvelles cibles de traitement identifiées peuvent fournir une solution de remplacement thérapeutique au régime contraignant sans gluten ; le but ultime étant de pouvoir améliorer la qualité de vie des patients souffrant de ce désordre. Une revue (Chapitre 1, dernière section) présentera les options thérapeutiques actuelles. Notre approche repose sur une action très en amont de la cascade, en masquant la protéine incriminée vis-à-vis des enzymes digestives, afin de l'éliminer de l'organisme avant la production de peptides toxiques. Notre choix s'est porté sur un composé polymère comme agent thérapeutique. Ci-après sont présentées des utilisations de polymères en thérapeutique. L'intérêt et les applications des polymères séquestrants par voie orale seront soulignés.

## **2 Les polymères synthétiques en tant qu'agents thérapeutiques**

### **2.1 Polymères en tant qu'excipients de formulation**

Depuis les années 90, l'utilisation des polymères dans le domaine de la santé est en plein essor (Duncan 2003a). Grâce à leur polyvalence, les polymères ont été employés pour diverses applications, allant de la reconstruction tissulaire ou dentaire aux applications pharmaceutiques pour la formulation de principes actifs. Les polymères sont souvent utilisés en thérapeutique pour synthétiser des pro-médicaments ou pour préparer des vecteurs.

#### **2.1.1 Utilisations des polymères en formulation**

Outre leur rôle traditionnel dans la préparation de formes pharmaceutiques classiques (comprimés, suspensions, etc.) les polymères permettent notamment une libération contrôlée et/ou ciblée des médicaments (Duncan 2003b). Les polymères peuvent être directement conjugués au principe actif (Van Hest 2007) ou utilisés dans des structures comme des implants (Perez-Marrero *et al.* 2004), des vésicules (Ahmed *et al.* 2006), des liposomes pH sensibles (Bertrand *et al.* 2009; Simard *et al.* 2009), des micelles (Dufresne *et al.* 2008; Jones *et al.* 2008; Elsabahy *et al.* 2009), des nanoparticules (Gaucher *et al.* 2009; Pouponneau *et al.* 2009), des dendrimères (Yellepeddi *et al.* 2009), des dendriplexes (Intra *et al.* 2010) ou encore des polyplexes (Duncan 2003a; Haag *et al.* 2006), afin de véhiculer différents agents actifs comme des principes actifs, des protéines ou des acides nucléiques. Selon l'effet recherché (*e.g.* circulation augmentée, libération au site d'action, libération prolongée), les caractéristiques du polymère doivent être adaptées et contrôlées (*e.g.* biodégradabilité, furtivité, masse molaire, charge, sensibilité au pH, à la température, au solvant).

Plusieurs formulations à base de polymères sont approuvées ou actuellement en cours d'essais cliniques.

## 2.1.2 Exemples de formulations sur le marché et en processus d'essais cliniques

### 2.1.2.1 Polymères conjugués à une protéine ou à un principe actif

De nombreux polymères conjugués à des protéines ont été développés afin de diminuer l'immunogénicité de la protéine native et d'améliorer la stabilité et la pharmacocinétique du composé (Haag *et al.* 2006). Des protéines PEGylées (*i.e.* modifiées par une chaîne de polyéthylène glycol) comme l'interféron- $\alpha$  (PEG-intron<sup>®</sup>), l'adénosine désaminase (Adagen<sup>®</sup>) et le facteur stimulant des colonies de granulocytes (G-CFS) (Neulasta<sup>®</sup>) (Vicent *et al.* 2009) sont approuvés par les autorités sanitaires. Par exemple, la conjugaison du PEG au Filgrastim a permis d'augmenter l'aire sous la courbe et de diminuer la clairance du Filgrastim améliorant ainsi sa biodisponibilité (Tableau 1-4). Le SMANCS, poly(acide maléique-*co*-styrène) conjugué à la néocarzinostatine (Zinostatin Stimaler<sup>®</sup>) (Vicent *et al.* 2009), est une autre protéine conjuguée qui a une autorisation de mise sur le marché indiquée dans le traitement des cancers hépatiques.

Parameter	Pegfilgrastim 100 $\mu\text{g/kg}$ ( $n=3$ ) [median (range)]	Filgrastim 5 $\mu\text{g/kg/day}$ ( $n=3$ ) [median (range)]
$C_{\text{max}}$ (ng/ml)	114 (58.1–203)	10.7 (9.15–15.5)
$t_{\text{max}}$ (h)	72.0 (24.0–96.0)	8.0 (8.0–8.0)
$t_{1/2}$ (h)	33.2 (30.3–53.8)	3.37 (3.10–4.84)
$\text{AUC}_{0-\infty}$ (ng/ml/h)	7150 (6320–24100)	126 (81.9–155)
CL/F (ml/h/kg)	14.0 (4.15–15.8)	39.6 (32.3–61.1)

$C_{\text{max}}$ =maximum plasma concentration;  $t_{\text{max}}$ =time to  $C_{\text{max}}$ ;  $t_{1/2}$ =terminal elimination half-life;  $\text{AUC}_{0-\infty}$ =area under the plasma concentration–time curve from time zero to infinity; CL/F=apparent serum clearance after s.c. administration.

Tableau 1-4. Exemple d'amélioration de la pharmacocinétique par PEGylation chez des femmes atteintes de cancer du sein (Molineux 2003).

Pharmacocinétique de PEG-G-CFS (Pegfilgrastim) et de G-GFS (Filgrastim). Augmentation des paramètres  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{max}}$ ,  $T_{1/2}$  et AUC et diminution de la clairance grâce à la PEGylation.

Outre les protéines, les polymères se sont aussi révélés attrayants pour le couplage avec des agents anticancéreux afin d'augmenter la solubilité des molécules actives, leur index

thérapeutique et d'accroître l'effet de rétention (effet EPR, « enhanced permeability and retention ») (Haag *et al.* 2006). Ce dernier est relié à la structure fenêtrée des tissus malins. Dans cette optique, un polymère de masse molaire importante est choisi et couplé au principe actif par une liaison clivable. Par exemple, le N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide conjugué à la doxorubicine (HPMA-DOX) ou le poly(acide glutamique) couplé au paclitaxel (PGA-PTX) sont des formulations actuellement en essais cliniques (Vicent *et al.* 2008). Dans le cas du HPMA-DOX, les études cliniques montrent que la dose maximum tolérée est multipliée par 5 sans aucun signe de toxicité cardiaque aigüe (Vasey *et al.* 1999). Cette formulation est en essai clinique de phase II. Dans le cas du PGA-PTX, la conjugaison permet d'améliorer le temps de demi-vie du paclitaxel et d'augmenter considérablement les doses administrables (Boddy *et al.* 2005). PGA-PTX (OPAXIO®) est en cours d'agrément par les autorités de santé depuis 2008 (Vicent *et al.* 2009).

#### 2.1.2.2 Polymères pour la formulation de vecteurs

Les polymères sont utilisés aussi en nanotechnologie pour la fabrication de vecteurs. Ces vecteurs ont pour but de transporter et protéger le principe actif jusqu'à sa cible.

Les micelles polymères sont des structures organisées résultantes de l'auto-assemblage des molécules de bloc-polymères amphiphiles au-dessus de leur CMC (concentration micellaire critique). La structure extérieure, hydrophile, assure la solubilisation du cœur hydrophobe de la micelle, qui sert de cargo pour les molécules actives hydrophobes. Grâce à leur stabilité et solubilité, les micelles sont particulièrement attrayantes pour le transport de molécules anticancéreuses. De plus, leur taille (20-100 nm) augmente l'accumulation et l'internalisation au site d'action tout en permettant une élimination rénale.

Par exemple, une formulation de doxorubicine sous forme de micelles polymères est en essai clinique au Japon (Aliabadi *et al.* 2006). Il s'agit de micelles formées par des blocs-polymères composés de poly(éthylène glycol) et de poly (acide aspartique). Une partie de la doxorubicine est couplée au polymère d'acide aspartique, l'autre partie est encapsulée dans le cœur de la micelle (Figure 1-3). Cette formulation a permis de multiplier par 2,5 le temps de demi-vie de la doxorubicine libre et d'en diminuer la clairance (Aliabadi *et al.* 2006).

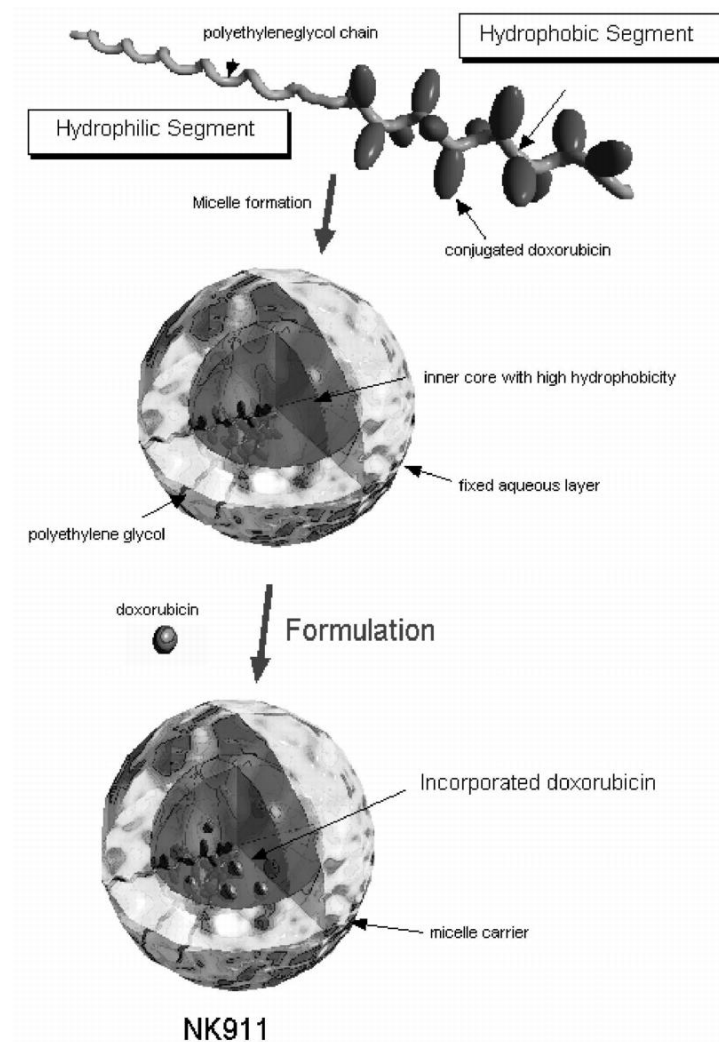


Figure 1-3. Structure des micelles polymères en étude clinique (NK 911) (Nakanishi *et al.* 2001).

Des essais cliniques de thérapie génique dans le traitement de tumeurs solides sont aussi en cours pour une formulation de siARN (small interfering RNA ou ARN interférant) avec deux polymères (Davis 2009; Vicent *et al.* 2009) (Figure 1-4). Le premier, un polymère cationique modifié par des cyclodextrines, permet l'appariement des siARN par

des interactions électrostatiques. Le second, un poly(éthylène glycol) modifié par un groupement adamantane (AD) AD-PEG s'ancrage dans le cœur des cyclodextrines par leur groupement AD hydrophobe. Les chaînes de PEG confèrent à la structure sa furtivité. De plus, les chaînes peuvent être aussi modifiées afin de permettre un ciblage actif de la particule.

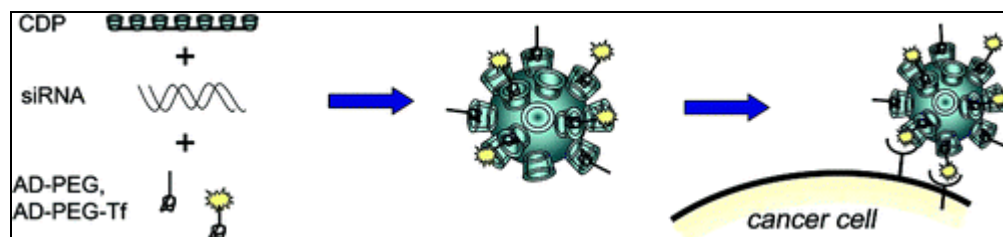


Figure 1-4. Système RONDEL™ de nanoparticules en phase clinique I/II pour la libération de siARN pour le traitement de tumeurs solides (Davis 2009).

### 2.1.2.3 Polymères pour la libération prolongée

Des formulations à base de polymères permettent d'internaliser des principes actifs et de contrôler la vitesse de libération du composé. La polymérisation du système peut s'effectuer *ex vivo* ou *in vivo*. En voici quelques exemples disponibles sur le marché.

Des implants hormonaux obtenus par polymérisation *ex vivo* (sous forme de bâtonnets) sont approuvés par les autorités de santé en Europe (IMPLANON®). Ils consistent en une matrice polymère, copolymère d'éthylène et d'acétate de vinyle, qui sert de réservoir non biodégradable. La libération des hormones s'effectue par diffusion et garantit une contraception sur 3 ans.

La technologie Prolease® consiste, elle aussi, en une polymérisation *ex vivo*, sous forme de microsphères. Ces dernières sont composées de poly(lactide-co-glycolide) biodégradable afin de contrôler la libération d'hormone. Les microsphères sont injectées en suspension par les voies intramusculaire ou sous-cutanée. Le mécanisme d'érosion du polymère entraîne la libération de l'hormone sur trois semaines (Enantone® (en Europe), Lupron® (au Canada)).

Le système Atrigel<sup>®</sup> est un système de libération contrôlée de médicament à polymérisation *in vivo*. Il met en jeu des polymères biodégradables sensibles à la séparation de phase. Ces polymères sont dissouts dans un solvant biocompatible dans lequel est ajouté le principe actif. Lors de l'injection sous-cutanée, le solvant se dissipe dans l'organisme et le polymère précipite. Ainsi, un implant est créé *in situ*, retenant le principe actif (Dong *et al.* 2006). La libération de ce dernier est ensuite contrôlée par l'érosion de la matrice polymère. Ce système a été mis à profit pour une formulation d'acétate de leuprorelina pour le traitement du cancer de la prostate à un stade avancé (Dunn *et al.* 2007) (Eligard<sup>®</sup> (en Europe et au Canada). Cette formulation utilise comme matrice le poly(lactide-*co*-glycolide) (75/25) dissouts dans le N-méthyl-2-pyrrolidone. Une étude clinique a montré qu'un dépôt de 22,5 mg de leuprorelina permettait une castration chimique prolongée efficace (soit une concentration de testostérone < 50 ng/dL dans le sérum) (Figure 1-5) (Chu *et al.* 2002).

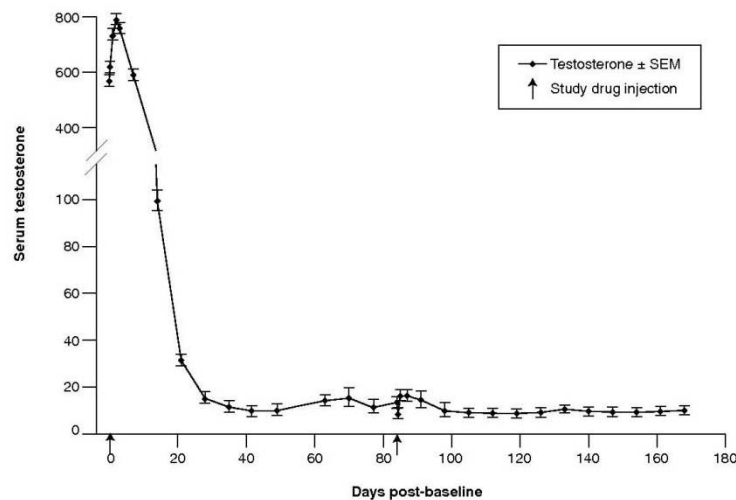


Figure 1-5. Concentration de testostérone (en ng/dL) dans le sang d'homme après injection d' Eligard<sup>®</sup> 22.5 (injection à Jour 0 et Jour 84)(Perez-Marrero *et al.* 2004). Un taux de testostérone bas est retrouvé durant 180 jours indiquant une castration chimique efficace.

Une autre formulation utilise ce système (Atridox<sup>®</sup>) pour la libération de doxycycline dans le traitement de la parodontite (Buchter *et al.* 2004; Fogueri *et al.* 2009).

Les polymères peuvent être aussi utilisés, non plus pour transporter puis libérer, mais pour capturer des molécules particulières. Ils sont qualifiés de polymères séquestrants, complexants ou liants.

## **2.2 Polymères en tant qu'agents actifs : séquestrants**

La grande particularité de ces polymères réside dans le fait qu'ils sont, au même titre que les principes actifs, des ingrédients pharmaceutiques actifs et non plus des excipients de formulation. De par l'adaptabilité du matériau (*i.e.* la fonctionnalisation et les caractéristiques physico-chimiques), il est concevable d'obtenir des séquestrants sur mesure, c'est-à-dire sélectifs et ayant une grande capacité de capture.

Par la voie intraveineuse (I.V.), les polymères séquestrants sont attrayants dans un contexte d'intoxication ou d'infection. Dans notre laboratoire, un PEG-caféine (20 kDa) a été développé en vue d'une détoxification des ions cadmium (Leblond, données non publiées). Des polymères de haute masse molaire, de type polyacrylamide, portant des groupements C-glycoside (un dérivé de l'acide sialique), ont montré *in vitro* qu'ils empêchaient l'héماغlutination entre le virus *Influenza A H3 N2* (souche X-31) et les cellules humaines (Sigal *et al.* 1996). Cependant, dans le cas d'une administration I.V. des études de biodistribution et toxicité poussées doivent être envisagées.

### **2.2.1 Polymères séquestrants oraux**

Étant donné que les séquestrants sont généralement caractérisés par une forte masse molaire, leur absorption suite à une administration orale est négligeable, leur conférant un profil de toxicité aiguë et chronique généralement sécuritaire. La combinaison de ces propriétés (*i.e.* polyvalence et faible biodisponibilité orale) a été exploitée afin d'obtenir une nouvelle classe médicamenteuse : les polymères séquestrants oraux. Cette nouvelle classe permet de retirer sélectivement de l'organisme des espèces nocives ou pathogènes, qu'elles soient endo ou exogènes, en les complexant dans le compartiment intestinal, entraînant une diminution de leur concentration systémique.



Les séquestrants *per-os* peuvent être utilisés pour lier tout un éventail de composés allant de molécules simples, comme des ions, à des composés très complexes comme des agents infectieux en passant par des principes actifs et des protéines. Ci-après sont exposés les principaux axes thérapeutiques dans lesquels les polymères séquestrants par voie orale sont utilisés ou investigués.

## 2.3 Applications thérapeutiques des séquestrants oraux

### 2.3.1 Dans l'insuffisance rénale : séquestrants d'ions

Des polymères séquestrants ou complexants sont utilisés en thérapeutique pour emprisonner des petites molécules comme les ions potassium et phosphate. En condition normale, les flux ioniques sont régulés majoritairement par le système rénal. En cas de mauvais fonctionnement de l'organe, on observe une augmentation des concentrations des espèces ioniques, entraînant des effets délétères sur l'état de santé du patient. Afin de réguler la balance électrolytique des patients souffrant d'insuffisance rénale, l'utilisation de séquestrants a été proposée.

#### 2.3.1.1 Traitement de l'hyperkaliémie

Le premier polymère envisagé fut pour le traitement de l'hyperkaliémie. Il s'agit d'une résine échangeuse d'ions à base de sulfonate de styrène. Ce système permet la chélation de potassium, par échange de sodium, au niveau de l'intestin. Le complexe résine/potassium est ensuite éliminé dans les selles. Ce composé a été développé puis mis sur le marché dans les années 70 sous le nom de Kayexalate® (Dhal *et al.* 2006). Malheureusement, un effet secondaire de ce traitement est lié à la libération de sodium dans l'intestin. Le sodium peut être réabsorbé et entraîner un risque d'hypertension associé à l'usage de ce composé. Un nombre important d'effets secondaires a aussi été rapporté comme des nécroses ou des ischémies intestinales (McGowan *et al.* 2008 ; McGowan *et al.* 2009; Montagnac *et al.* 2009; Thomas *et al.* 2009; Trottier *et al.* 2009). Un analogue, le Kalimate®, utilisant le calcium à la place du sodium comme ion échangeable, présente, lui aussi, d'importants effets secondaires (Masuda *et al.* 2006 ; Joo *et al.* 2009).

### 2.3.1.2 Traitement de l'hyperphosphatémie.

Dans les cas d'insuffisance rénale sévère, les patients peuvent souffrir d'hyperphosphatémie. Des séquestrants efficaces à base d'aluminium ou de calcium ont été largement utilisés (Bellasi *et al.* 2006). Mais ces composés présentent de nombreux effets secondaires, notamment neurologiques et cardiaques, limitant leur utilisation à long terme (Bellasi *et al.* 2006).

Des récepteurs synthétiques de phosphate, à base d'amines ou de guanidines (Dhal *et al.* 2005) ont été imaginés grâce à des études de reconnaissance. Les mécanismes qui gouvernent ces associations sont les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène (Figure 1-6). Ces découvertes ont ensuite conduit à la synthèse d'une résine fonctionnalisée avec des guanidines (Hider *et al.* 1997) et à des polymères avec de nombreux groupements amine. Cependant, les résines avec des groupements guanidine n'ont fait l'objet d'aucune publication concernant des études biologiques.

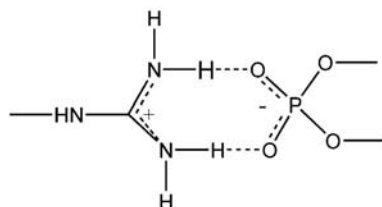


Figure 1-6. Exemple de liaisons hydrogène et électrostatiques entre un ion phosphate et un groupement guanidine (Dhal *et al.* 2005).

Dans le cas des polymères avec des groupements amine, le pH conditionne le degré d'ionisation du composé, donc son efficacité. Il est aussi important de considérer les répulsions liées aux charges. Il est alors parfois recommandé d'ajouter des groupements espaceurs afin d'optimiser la capacité de capture du composé (Dhal *et al.* 2006). En 1998, le premier sequestrant du phosphate sans ion métallique, l'hydrochlorure de sevelamer, a été mis sur le marché sous le nom de RenaGel<sup>®</sup>. Il s'agit d'un hydrogel de polyallylamine.

Ce composé lie les phosphates alimentaires grâce à des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogène (Figure 1-7). Le complexe résultant est éliminé dans les selles, diminuant l'absorption et par conséquent la concentration systémique de phosphates (Slatopolsky *et al.* 1999; Goldsmith *et al.* 2008). Ce composé s'est montré bénéfique comparativement à des séquestrants traditionnels à base d'aluminium ou de calcium. (Katopodis *et al.* 2006). De plus, il a montré des profils lipidiques améliorés ainsi que des effets positifs sur la calcification artérielle (Hervas *et al.* 2003; Katopodis *et al.* 2006; Goldsmith *et al.* 2008). Récemment, une étude a révélé un effet secondaire positif surprenant : un mécanisme anti-inflammatoire. Les endotoxines, de nature lipopolyssaccharidique, seraient capturées dans l'intestin par l'hydrochlorure de sevelamer, entraînant une diminution de leur concentration systémique. Il en résulterait une diminution de l'inflammation. Tous ces résultats confèrent au sevelamer un statut intéressant dans la prise en charge des personnes souffrant d'insuffisance rénale sévère.

Un dérivé de l'hydrochlorure de sevelamer, le carbonate de sevelamer (Renvela<sup>®</sup>) a été développé afin de pallier à l'acidose observée avec le dérivé chloré. Ce composé est actuellement en essai clinique de phase III. Un autre composé polymère, AMG 223 (ou APS 1585) est aussi en phase III (Qunibi 2009).

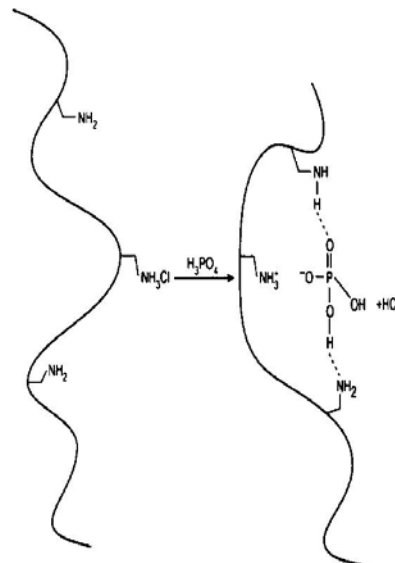


Figure 1-7. Interactions électrostatiques et hydrogène entre le sevelamer et les ions phosphate (b) (Dhal *et al.* 2006).

Plus récemment, des structures dendrimères (structures tridimensionnelles hyperbranchées qui croient par polymérisation, par génération et de façon arborescente) à base de diaminobutane ont été développées pour séquestrer le phosphate (Williams *et al.* 2009). Le dendrimère administré chez des rats a montré une augmentation de l'excrétion fécale de phosphate ainsi qu'une diminution de phosphate sanguin, et ce, de façon dose-dépendante (Figure 1-8).

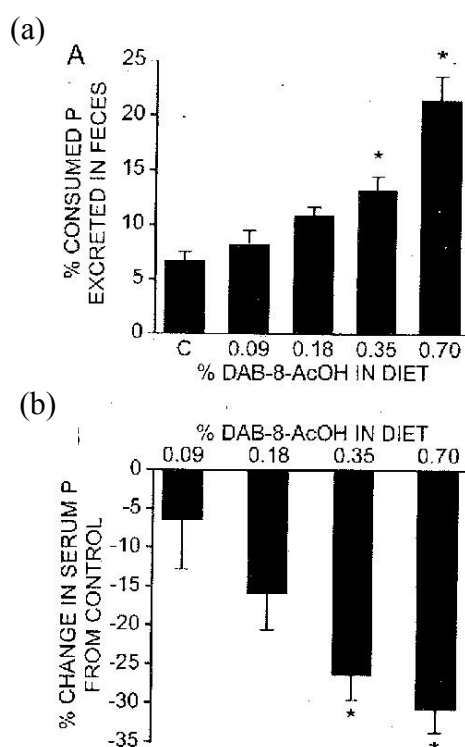


Figure 1-8. Excrétion fécale de phosphore (a) et phosphore sanguin (b) en présence du dendrimère ( $p < 0.05$ )(Williams *et al.* 2009).

### 2.3.2 Dans l'hémochromatose: séquestrants du fer

Mis à part les déficiences rénales, les polymères complexants présentent une application potentielle dans le traitement de maladies liées à un excès de fer comme l'hémochromatose. Actuellement, on a recours à un chélateur, la desferrioxamine (DFO) un sidérophore bactérien, pour pallier à ces surcharges en fer (Rossi *et al.* 2009). Cependant,

cet agent présente une faible biodisponibilité *per os* obligeant à réaliser une administration par voie parentérale. Des modifications par des chaînes de PEG sont à l'étude pour améliorer le schéma d'administration (Rossi *et al.* 2009). Une autre voie, moins invasive, serait souhaitable et l'utilisation de polymères séquestrants *per os* semble une solution attrayante. Les mécanismes de base qui gouvernent ces interactions sont des interactions de coordination ou électrostatiques.

### 2.3.2.1 Groupements fonctionnels hydroxamates et catéchols

Imitant les groupes fonctionnels des sidérophores naturels (DFO et entérobactine), des hydrogels réticulés portant des groupements hydroxamates ont été synthétisés afin de séquestrer les Fe (II) et (III) (Polomoscanik *et al.* 2005) grâce à des interactions de coordination (Figure 1-9). Ces polymères ont été testés chez les rats montrant une diminution de l'absorption du fer qui est illustré par une diminution de l'hématocrite. (*i.e.* passage de 8.9 à 10.9 g/dL pour le contrôle et de 8.9 à 6.5 g/dL pour le groupe traité avec 2% de séquestrant) (Tableau 1-5) et une bonne biocompatibilité (Polomoscanik *et al.* 2005).

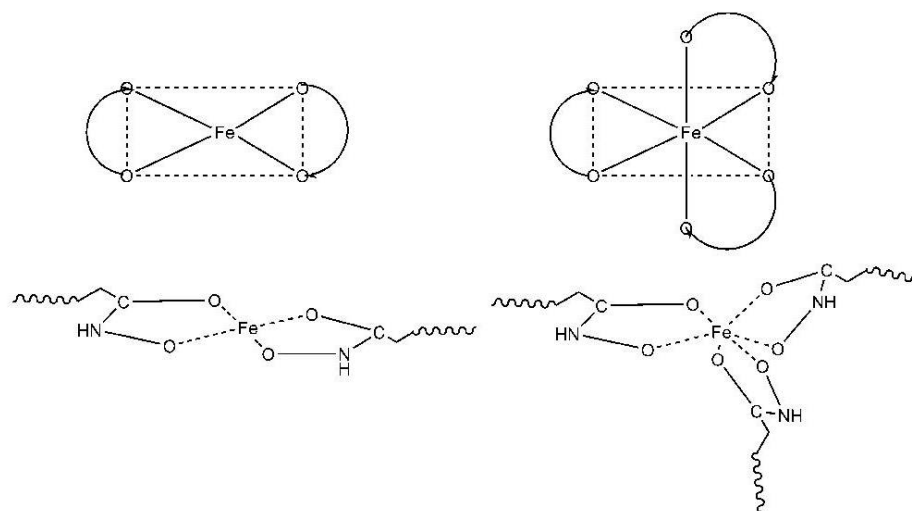


Figure 1-9. Représentation schématique de l'interaction du Fe (II) et Fe (III) avec les groupements hydroxamate (Polomoscanik *et al.* 2005).

	initial <sup>b</sup> hematocrit, %	final <sup>c</sup> hematocrit, %	initial <sup>b</sup> hemoglobin, g/dL	final <sup>c</sup> hemoglobin, g/dL
control animals with 20 ppm iron in diet	43.2	47.75	11.45	13.5
control animals with iron-free diet	43.2	25.6	11.45	6.75
20ppm iron diet fed after iron-free diet treatment	32.9	40.0	8.9	10.9
20 ppm dietary iron + 0.2% (w/w) polymeric chelator	32.9	39.1	8.9	10.75
20 ppm dietary iron + 1% (w/w) polymeric chelator	32.9	36.5	8.9	9.38
20 ppm dietary iron + 2% (w/w) polymeric chelator	32.9	33.2	8.9	6.5

<sup>a</sup> In all cases *p* value is at least <0.01. <sup>b</sup> End of induction. <sup>c</sup> After treatment.

Tableau 1-5. Limitation de l'absorption de fer *in vivo* par un polymère fonctionnalisé à l'aide de groupements hydroxamates (Polomoscanik *et al.* 2005).

### 2.3.2.2 Groupements fonctionnels dérivés de la pyridine

Des polymères méthacryliques, modifiés par des dérivés de pyridine donneurs d'électrons, ont aussi été développés. Ils ont démontré une bonne capacité à capter le fer, notamment le Fe (III) *in vitro* (Zhou *et al.* 2008) et à réduire son absorption intestinale. Cependant, aucune donnée *in vivo* n'est actuellement disponible.

Des dendrimères présentant des fonctions hydroxypyridones (Figure 1-10) ont aussi été synthétisés montrant une bonne efficacité *in vitro* (Zhou *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2006). Des études de biodisponibilité ont été planifiées (Zhou *et al.* 2006) avec un marquage au <sup>14</sup>C du dendrimère mais aucune donnée n'est encore publiée.

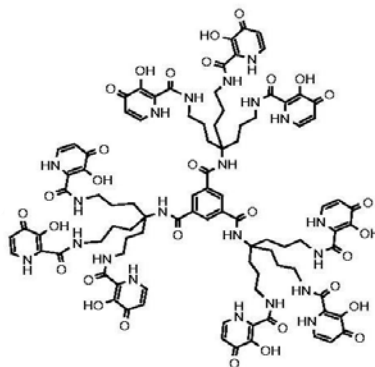


Figure 1-10. Structure du dendrimère séquestrant le fer portant des dérivés hexadentate-3-hydroxypyridine-4-one (Zhou *et al.* 2006).

### 2.3.3 Dans l'hypercholestérolémie : séquestrants de sels biliaires.

Les agents complexants font partie de l'arsenal thérapeutique cardio-vasculaire en permettant la capture des acides biliaires. Les acides biliaires sont des dérivés du cholestérol. En retirant des acides biliaires du cycle entéro-hépatique (Dowling 1973) (Figure 1-11), leur synthèse hépatique à partir du cholestérol est activée entraînant la diminution du taux de cholestérol sanguin.

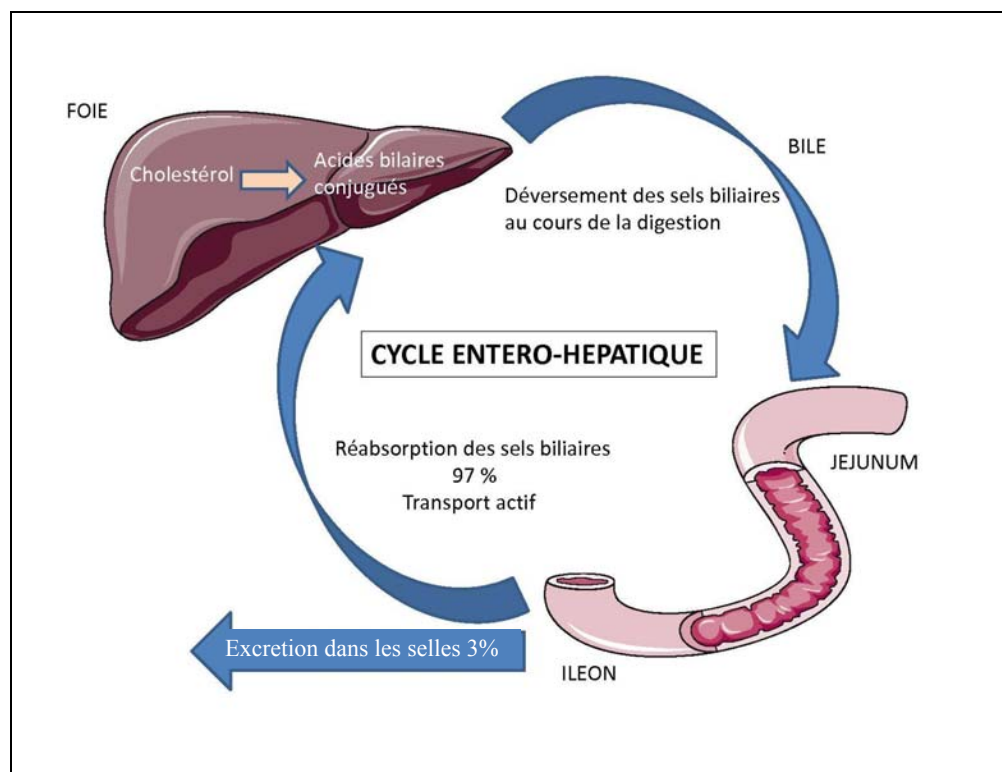


Figure 1-11. Schéma du cycle entéro-hépatique. Schéma adapté de Dowling (1973).

Les acides biliaires sont synthétisés au niveau du foie à partir du cholestérol, puis libérés dans l'intestin au cours de la digestion. Les acides biliaires sont ensuite en majorité (97%) réabsorbés par transport actif et une faible fraction est excrétée (3%).

#### 2.3.3.1 Groupements fonctionnels cationiques

Le colestipol (Colestid®) et la cholestyramine (Questran®) sont des composés de première et seconde générations, respectivement, qui consistent en des résines cationiques échangeuses d'ions, non absorbables, capables de séquestrer les acides biliaires anioniques

grâce à des interactions électrostatiques (Thomas *et al.* 1978 ; Insull *et al.* 1991; Insull 2006). Le complexe résine/acides biliaires est ensuite éliminé dans les selles. Malgré une biodistribution favorable, cette approche nécessite une forte dose quotidienne (env. 20-24 g/j) pour atteindre une efficacité thérapeutique, à cause de la faible capacité de rétention des sels biliaires, qui peuvent être réabsorbés.

### 2.3.3.2 Groupements fonctionnels anioniques et hydrophobes.

Des études plus poussées sur la structure des acides biliaires ont permis de diminuer le phénomène de désorption. Afin d'optimiser la séquestration, des groupements hydrophobes ont été introduits pour améliorer la liaison acides biliaires/résine et diminuer la désorption des acides biliaires. Cela a donné naissance au colesevelam (Welchol<sup>®</sup> ou Cholestagel<sup>®</sup>) (Figure 1-12(a)) et au colestimide (Cholebine<sup>®</sup>) (Figure 1-12(b)), des séquestrants d'acides biliaires commercialisés de troisième génération. De plus, ces résines ont une capacité de gonflement facilitant l'accès des acides biliaires aux groupements liants. Ces dérivés de troisième génération présentent une meilleure capacité de rétention, une meilleure sélectivité et une plus forte interaction avec les acides biliaires (Dhal *et al.* 2006).

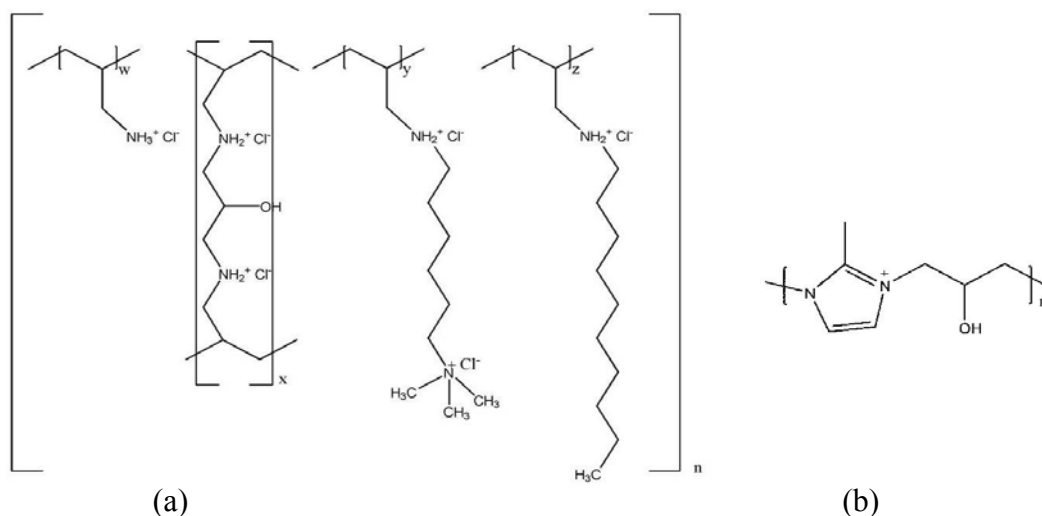


Figure 1-12. Structure du colesevelam (a) et du colestimide (b) (Dhal *et al.* 2006).



Ces deux composés sont indiqués seuls ou en combinaison avec d'autres régulateurs du métabolisme des lipides. Récemment, le colesevelam a montré d'intéressantes propriétés dans la régulation de la glycémie et a été approuvé pour le traitement du diabète de type II (Tziomalos *et al.* 2009). Cependant, le mécanisme d'action sur le métabolisme des glucides n'est pas encore élucidé (Staels 2009). Colestimide est aussi actuellement en phase clinique III en vue d'une application dans l'hyperphosphatémie.

#### 2.3.3.3 Reconnaissance par empreinte moléculaire

En parallèle, une approche basée sur les polymères à impression moléculaire est développée pour emprisonner les sels biliaires (Huval *et al.* 2004). Leur structure est basée sur un polyammonium réticulé avec des agents aminés. La réticulation se fait en présence de la molécule d'intérêt, ici le cholate de sodium, qui est alors imprimée en formant des cavités spécifiques lors de la synthèse. Le cholate est éliminé par lavages successifs et permet d'obtenir une empreinte en trois dimensions de la molécule. Il s'agit alors d'une reconnaissance très pointue du type clef/serrure entre le séquestrant et le sel biliaire. Les résultats *in vivo* montrent une bonne capacité de séquestration (Huval *et al.* 2004).

#### 2.3.4 Contre l'obésité : séquestrants de lipides

L'obésité est largement reliée à la consommation de lipides, plus particulièrement de triglycérides. Chaque triglycéride est lysé par des lipases en deux acides gras et du glycérol couplé à un acide gras. Ces produits enzymatiques seront ensuite absorbés au niveau de la bordure en brosse de l'intestin. L'inhibition de la lipase est une stratégie actuellement utilisée dans le traitement de l'obésité (Orlistat, Xenical®). Ce traitement diminue la dégradation donc l'absorption des triglycérides. Ces derniers sont éliminés dans les selles, générant un inconfort, car les selles sont « huileuses ». L'utilisation de polymère dans le traitement de l'obésité vise à diminuer l'absorption des graisses en évitant les selles huileuses (Holmes-Farley 2005). Un brevet a été déposé pour un copolymère portant des groupements boronates. La partie polymère séquestrerait les lipides et les groupements boronates, par libération d'acide aryl boronique, inhiberaient la lipase (Mandeville 2000; Jozefiak *et al.* 2001; Holmes-Farley *et al.* 2003). À ce jour, aucune donnée n'a été publiée,

mais des communications lors de congrès ont été répertoriées sur une possible exploitation industrielle et des essais cliniques de phase I (Holmes-Farley 2005; Mandeville 2005).

### **2.3.5 Dans les intoxications : séquestrants de principes actifs**

Les intoxications sont dues à une prise massive, volontaire ou non, de molécules actives. Pour la plupart des molécules, il n'existe pas d'antidote et le traitement de première ligne est le recours aux lavages gastriques et au charbon activé afin d'éliminer la majeure partie de la molécule incriminée de l'organisme (Leroux 2007). Le recours à des séquestrants à impression moléculaire permettrait d'améliorer la spécificité du traitement tout en diminuant sa toxicité. Récemment, cette approche a été développée en vue d'une application de détoxification d'un principe actif, le diltiazem, fréquemment recensé dans les décès par surdosage. Le poly(butadiène-anhydride maléique) et l'agent réticulant l'éthylène diamine ont été choisis pour former la structure tridimensionnelle. Une étude de séquestration a révélé une forte affinité du polymère envers le diltiazem ( $K_d = 1,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) (Önen *et al.* 2009).

### **2.3.6 Dans les diarrhées : séquestrants de protéines toxiques**

L'avancement des connaissances des mécanismes gouvernant la séquestration a permis la mise au point de polymères contre des molécules plus complexes, par exemple les protéines toxiques de *Clostridium difficile* responsables de diarrhées sévères. Le polymère cible la neutralisation de la toxine. L'avantage majeur de cette approche est que le risque de développer des bactéries résistantes est nul, contrairement aux traitements antibiotiques classiques (métronidazole ou vancomycine), car la destruction de la bactérie n'est plus visée. D'autre part, cette approche ne perturbe pas la flore intestinale, diminuant le risque de récidives ou d'infections ultérieures (Weiss 2009).

#### *2.3.6.1 Groupements fonctionnels anioniques.*

Le tolevamer (poly(styrène sulfonate)) ne possède pas d'activité antimicrobienne intrinsèque et ne doit son activité qu'à ses capacités séquestrantes que lui confèrent sa structure (Barker *et al.* 2006). Il s'agit d'un polymère anionique de haute masse molaire

capable de séquestrer l'entérotoxine (toxine A), de façon majoritaire, et la cytotoxine (toxine C) (Louie *et al.* 2006). Ce polymère, à une dose de 6 g/jour, s'est révélé aussi efficace que la vancomycine à 500 mg/jour et il a montré une diminution de la récurrence des épisodes diarrhéiques. Cependant, une hypokaliémie a été observée (Louie *et al.* 2006) ce qui a incité à une nouvelle formulation incluant du sodium et du potassium (Peppe *et al.* 2008). Une étude de phase III comparant le tolevamer à la vancomycine et au métronidazole a montré une efficacité modérée comparativement aux 2 traitements de référence. Cependant, le tolevamer serait associé à un moindre risque de rechutes (Tableau 1-6) (Bartlett 2009; Weiss 2009).

Tableau 1-6. Résumé de l'efficacité et de la récurrence des infections à *Clostridium difficile* (tolevamer versus antibiotiques). Essai clinique de phase III (Weiss 2009). Le tolevamer montre une action discrète comparativement aux antibiothérapies, mais engendre moins de récurrences.

Study	Agent	Clinical success (%)	Recurrence rate (%)
GD3-170-301 [24] <sup>a</sup>	Tolevamer (n = 266)	46 <sup>c</sup>	3 <sup>d</sup>
GD3-170-301 [24]	Vancomycin (n = 134)	81	23
GD3-170-301 [24]	Metronidazole (n = 143)	72	27
GD3-170-302 [25] <sup>b</sup>	Tolevamer (n = 268)	42 <sup>c</sup>	6
GD3-170-302 [25]	Vancomycin (n = 125)	81	18
GD3-170-302 [25]	Metronidazole (n = 135)	73	19

<sup>a</sup> n = 574; n = 543 available for full analysis.

<sup>b</sup> n = 528.

<sup>c</sup> p < 0.001.

<sup>d</sup> p < 0.001.

[24] Louie TJ *et al.* Results of a phase III study comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD). In: Program and Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); 17–20 September 2007; Chicago, IL. Washington, DC: ASM Press; 2007. Abstract K-4259.

[25] Bouza *et al.* Results of a phase III trial comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. In: 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); 19–22 April 2008; Barcelona, Spain.

### 2.3.6.2 Groupements fonctionnels polysaccharidiques.

Il a été observé que les toxines de *C. difficile* miment l'activité des lectines en se liant à des récepteurs saccharidiques sur les cellules. À partir de cette observation, il a été imaginé que la toxine pourrait être neutralisée par le moyen d'oligosaccharides (*e.g.* maltose, isomaltotriose) greffés sur des structures polymères de type polystyrène (Heerze *et al.* 2002). Ces composés, regroupés sous le nom de SYNSORB<sup>®</sup> (Weiss 2009), se sont révélés efficaces sur des modèles animaux, sans malheureusement démontrer les résultats escomptés lors des essais cliniques de type II (Dhal *et al.* 2005 ; Weiss 2009).

Se basant sur la reconnaissance spécifique de la toxine de *Shigella dysenteriae* par le récepteur saccharidique B5 cellulaire, Kitov *et al.* ont développé une structure saccharidique en étoile à 5 branches, STARFISH. Cette structure a montré une très forte affinité pour la toxine et une protection de cellules en culture vis-à-vis de la toxine (Kitov *et al.* 2000). Cependant, les résultats *in vivo* ne se sont pas montrés très probants (Mulvey *et al.* 2003).

Ce même groupe a récemment publié une nouvelle approche. Des polymères, de structure polyacrylamide avec des groupements bi-fonctionnels (R) et (S) (BAIT pour hameçon). Ces polymères ((S) ou (R)-polyBAIT) (Figure 1-13) reconnaissent la toxine et l'HuSAP (Human Serum Amyloid P), une protéine du système immunitaire. Le composé (S) a donné des résultats encourageants *in vitro* comparativement au composé (R) soulignant l'importance de la conformation tridimensionnelle pour l'interaction entre la toxine et HuSAP. *In vivo*, le composé (S) s'est avéré meilleur que le STARFISH en terme de survie des souris. De plus, le (S)-polyBAIT prévenait la dissémination de la bactérie chez les souris (Figure 1-14) (Kitov *et al.* 2008).

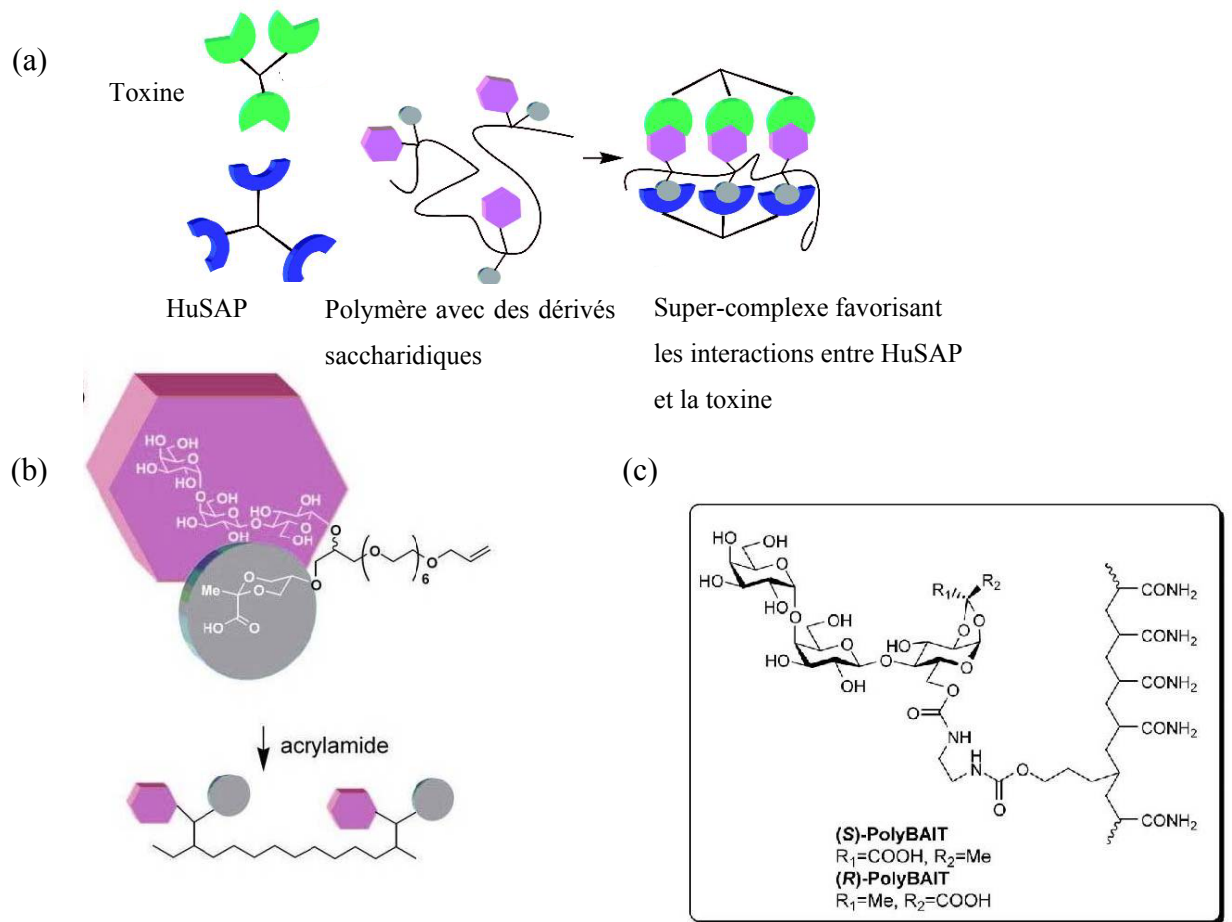


Figure 1-13. Schéma fonctionnel du concept de formation de complexe HuSAP et toxine (a). Schéma (b) et structure (c) du poly(acrylamide) modifié par des ligands bifonctionnels BAIT (adapté de Kitov *et al.* 2008).

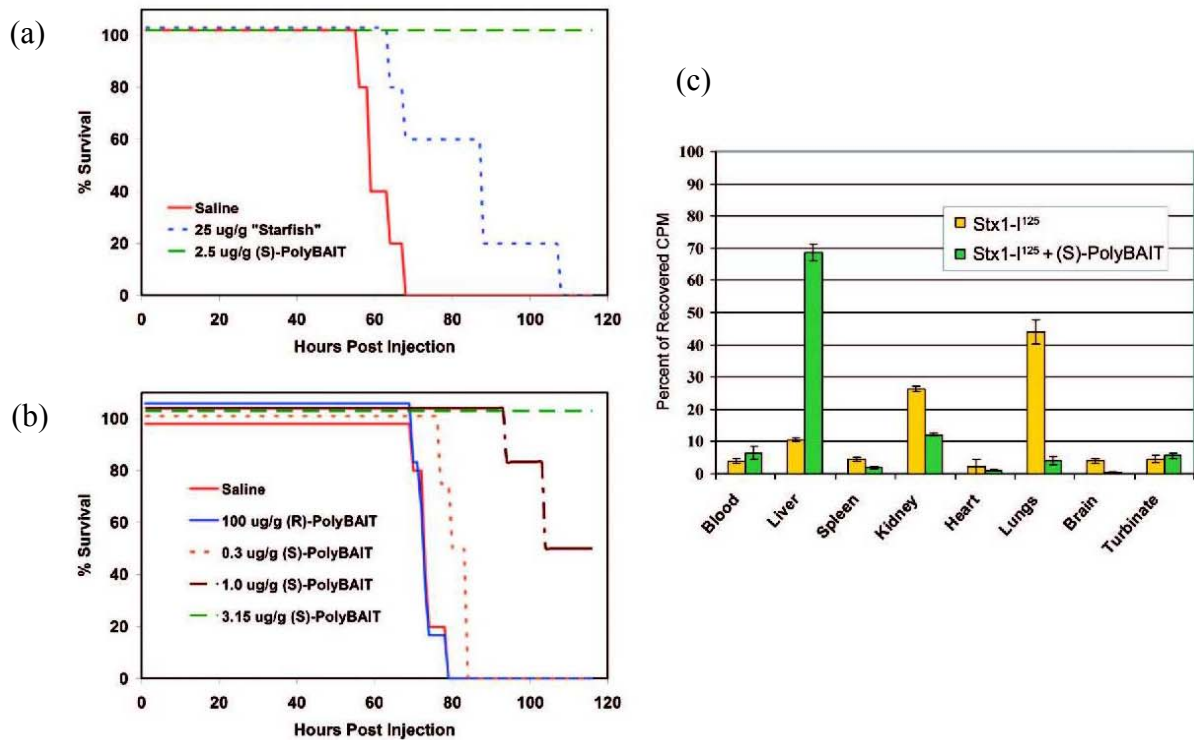


Figure 1-14. Schéma de survie de souris transgéniques pour HuSAP (a et b) et biodistribution de la toxine (c) (adapté de Kitov *et al.* 2008). Survie des souris suite à l'inoculation du mélange Shiga-toxine/ polymère par la voie intra-veineuse (a) ou par inoculation dorsale de la toxine par la voie sous-cutanée puis du polymère par la voie intra-veineuse (b). Biodistribution de la <sup>125</sup>I-toxine, à 4 h, par inoculation sous-cutanée suivie de l'administration du polymère par la voie intraveineuse (c).

### 2.3.6.3 Groupes fonctionnels “peptidoïdes”

Une récente étude d'une bibliothèque de « peptidoïdes » greffés sur des billes de TenTagel™ (Figure 1-15) a permis de sélectionner une série de composés qui liaient la toxine du *Vibrio cholerae*. En culture sur des cellules T-84, cellules issues de carcinome de colon humain, l'incubation a permis de diminuer drastiquement l'hypersécrétion induite par la toxine, indiquant que la toxine était vraisemblablement séquestrée (Simpson *et al.* 2009). Des essais *in vivo* ont été prévus, mais aucune donnée n'est actuellement disponible.

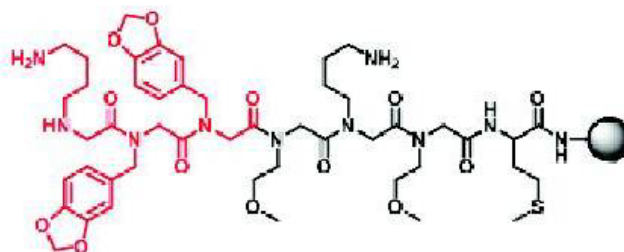


Figure 1-15. Structure générale des peptidoïdes (Simpson *et al.* 2009).

### 2.3.7 Dans les infections : séquestrants de pathogènes bactériens

Le développement de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques incite au développement d'alternatives thérapeutiques. Les polymères complexants présentent l'avantage de ne pas engendrer de résistance, devenant alors des candidats anti-infectieux attrayants.

#### 2.3.7.1 Groupements fonctionnels osidiques

Les bactéries possèdent des adhésines pour s'accrocher aux cellules hôtes *via* des glycolipides ou des glycoprotéines. L'idée a émergé de greffer des dérivés osidiques sur des polymères afin de capturer les bactéries et les empêcher d'adhérer à la muqueuse hôte (Mandeville *et al.* 1997). Bien que certains polymères de cette famille aient montré des résultats encourageants *in vitro* (Dhal *et al.* 2005), aucune étude *in vivo* n'a été publiée pour confirmer ces données.

#### 2.3.7.2 Groupements fonctionnels cationiques

L'utilisation de polymères cationiques afin de lyser les cellules bactériennes a aussi été évaluée. Le mécanisme expliquant la lyse est l'interaction des charges positives du polymère avec les charges négatives des phospholipides membranaires.

Certains polymères portant des groupements amine et ammonium quaternaire ont montré une activité efficace contre certaines bactéries notamment *Cryptosporidium parvum* (Mandeville *et al.* 1998) et même de façon améliorée comparativement à un traitement

antibiotique usuel avec de la paromycine (Dhal *et al.* 2005). Cependant, aucune étude ultérieure n'a été rapportée.

En résumé, les polymères en tant qu'agents thérapeutiques ont un incroyable potentiel pour le développement de nouveaux traitements dans des pathologies très diverses. Ils peuvent être synthétisés sur mesure après une étude adéquate de la cible et des interactions possibles, car leur nature et leurs propriétés peuvent être aisément modulées. Ils sont très polyvalents et adaptables. Ces qualités font des polymères des outils intéressants dans le traitement de la maladie cœliaque. En effet, la protéine toxique, la gliadine, est bien caractérisée et cette maladie n'a pour l'heure aucun traitement, excepté la diète sans gluten. La revue suivante illustre l'état actuel des découvertes en ce qui concerne la prévention et les options de traitement de la maladie cœliaque.

### 3 Bibliographie

- Abu-Zekry, M., Kryszak, D., Diab, M., Catassi, C. and Fasano, A. (2008). "Prevalence of celiac disease in Egyptian children disputes the east-west agriculture-dependent spread of the disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr 47(2): 136-40.
- Ahmed, F., Pakunlu, R. I., Brannan, A., Bates, F., Minko, T. and Discher, D. E. (2006). "Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug." J Control Release 116(2): 150-158.
- Alaedini, A. and Green, P. H. (2005). "Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder." Ann Intern Med 142(4): 289-98.
- Aliabadi, H. M. and Lavasanifar, A. (2006). "Polymeric micelles for drug delivery." Exp Opin Drug Deliv 3(1): 139-162.
- Antunes, H., Abreu, I., Nogueiras, A., Sa, C., Goncalves, C., Cleto, P., Garcia, F., Alves, A. and Lemos, D. (2006). "[First determination of the prevalence of celiac disease in a Portuguese population]." Acta Med Port 19(2): 115-20.
- Armstrong, M. J., Robins, G. G. and Howdle, P. D. (2009). "Recent advances in coeliac disease." Curr Opin Gastroenterol 25(2): 100-9.
- Askling, J., Linet, M., Gridley, G., Halstensen, T. S., Ekstrom, K. and Ekbom, A. (2002). "Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis." Gastroenterology 123(5): 1428-35.



- Bai, J. C., Gonzalez, D., Mautalen, C., Mazure, R., Pedreira, S., Vazquez, H., Smecuol, E., Siccardi, A., Cataldi, M., Niveloni, S., Boerr, L. A. and Maurino, E. (1997). "Long-term effect of gluten restriction on bone mineral density of patients with coeliac disease." Aliment Pharmacol Ther 11(1): 157-164.
- Barker, R. H., Jr., Dagher, R., Davidson, D. M. and Marquis, J. K. (2006). "Review article: tolevamer, a novel toxin-binding polymer: overview of preclinical pharmacology and physicochemical properties." Aliment Pharmacol Ther 24(11-12): 1525-34.
- Bartlett, J. G. (2009). "New antimicrobial agents for patients with *Clostridium difficile* infections." Curr Infect Dis Rep 11(1): 21-28.
- Bellasi, A., Kooienga, L. and Block, G. A. (2006). "Phosphate binders: new products and challenges." Hemodial Int 10(3): 225.
- Ben Hariz, M., Kallel-Sellami, M., Kallel, L., Lahmer, A., Halioui, S., Bouraoui, S., Laater, A., Sliti, A., Mahjoub, A., Zouari, B., Makni, S. and Maherzi, A. (2007). "Prevalence of celiac disease in Tunisia: mass-screening study in schoolchildren." Eur J Gastroenterol Hepatol 19(8): 687-94.
- Bertrand, N., Fleischer, J. G., Wasan, K. M. and Leroux, J. C. (2009). "Pharmacokinetics and biodistribution of N-isopropylacrylamide copolymers for the design of pH-sensitive liposomes." Biomaterials 30(13): 2598-605.
- Bhattacharya, M., Dubey, A. P. and Mathur, N. B. (2009). "Prevalence of Celiac disease in north Indian children." Indian Pediatr 46(5): 415-7.
- Biagi, F. and Corazza, G. (2010). "Mortality in celiac disease." Nat Rev Gastroenterol Hepatol 7: 158-162.
- Bingley, P. J., Williams, A. J., Norcross, A. J., Unsworth, D. J., Lock, R. J., Ness, A. R. and Jones, R. W. (2004). "Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study." BMJ 328(7435): 322-3.
- Boddy, A. V., Plummer, E. R., Todd, R., Sludden, J., Griffin, M., Robson, L., Cassidy, J., Bissett, D., Bernareggi, A., Verrill, M. W. and Calvert, A. H. (2005). "A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex (XYOTAX), investigating both 3-weekly and 2-weekly schedules." Clinical Cancer Research 11(21): 7834-7840.
- Bourgey, M., Calcagno, G., Tinto, N., Gennarelli, D., Margaritte-Jeannin, P., Greco, L., Limongelli, M. G., Esposito, O., Marano, C., Troncone, R., Spanpanato, A., Clerget-Darpoux, F. and Sacchetti, L. (2007). "HLA related genetic risk for coeliac disease." Gut 56(8): 1054-9.
- Buchter, A., Meyer, U., Kruse-Losler, B., Joos, U. and Kleinheinz, J. (2004). "Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomised controlled trial." Br J Ora Maxillofac Surg 42(5): 439-444.

- Cataldo, F. and Montalto, G. (2007). "Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem." World J Gastroenterol 13(15): 2153-9.
- Catassi, C., Doloretta Macis, M., Ratsch, I. M., De Virgiliis, S. and Cucca, F. (2001). "The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence." Tissue Antigens 58(6): 402-6.
- Challar, M. H., Jouma, M. and Sitmann, F. C. (2004). "Prevalence of asymptomatic celiac disease in a syrian population sample." JABMS 6: 155-60.
- Chu, F. M., Jayson, M., Dineen, M. K., Perez, R., Harkaway, R. and Tyler, R. C. (2002). "A Clinical Study Of 22.5 mg. La-2550: A New Subcutaneous Depot Delivery System For Leuprolide Acetate For The Treatment Of Prostate Cancer." The Journal of Urology 168(3): 1199-1203.
- Ciclitira, P. J., Johnson, M. W., Dewar, D. H. and Ellis, H. J. (2005). "The pathogenesis of coeliac disease." Mol Aspects Med 26(6): 421-58.
- Corazza, G., Valentini, R. A., Frisoni, M., Volta, U., Corrao, G., Bianchi, F. B. and Gasbarrini, G. (1992). "Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients." Gastroenterology 103(5): 1517-22.
- Corrao, G., Corazza, G. R., Bagnardi, V., Brusco, G., Ciacci, C., Cottone, M., Sategna Guidetti, C., Usai, P., Cesari, P., Pelli, M. A., Loperfido, S., Volta, U., Calabro, A. and Certo, M. (2001). "Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study." Lancet 358(9279): 356-61.
- Cosnes, J., Cellier, C., Viola, S., Colombel, J. F., Michaud, L., Sarles, J., Hugot, J. P., Ginies, J. L., Dabadie, A., Mousterde, O., Allez, M. and Nion-Larmurier, I. (2008). "Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: Protective effect of the gluten-free diet." Clini Gastroenterol Hepatol 6(7): 753-758.
- Craig, D., Robins, G. and Howdle, P. D. (2007). "Advances in celiac disease." Curr Opin Gastroenterol 23(2): 142-8.
- Davis, M. E. (2009). "The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic." Mol Pharm 6(3): 659-668.
- Dewar, D., Pereira, S. P. and Ciclitira, P. J. (2004). "The pathogenesis of coeliac disease." Int J Biochem Cell Biol 36(1): 17-24.
- Dewar, D. H., Amato, M., Ellis, H. J., Pollock, E. L., Gonzalez-Cinca, N., Wieser, H. and Ciclitira, P. J. (2006). "The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease." Eur J Gastroenterol Hepatol 18(5): 483-91.

- Dhal, P. K., Holmes-Farley, R. S., Huval, C. C. and Jozefiak, T. H. (2006). "Polymers as drugs." Adv Polym Sci 192: 9-58.
- Dhal, P. K., Huval, C. C. and Holmes-Farley, S. R. (2005). "Functional Polymers as Human Therapeutic Agents." Ind Eng Chem Res 44(23): 8593-8604.
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M. M., Paulli, M., Cifone, M. G. and Corazza, G. R. (2006). "Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease." Gut 55(4): 469-77.
- Di Sabatino, A. and Corazza, G. R. (2009). "Coeliac disease." Lancet 373(9673): 1480-93.
- Dicke, W. K., Weijers, H. A. and Van De Kamer, J. H. (1953). "Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease." Acta Paediatr 42(1): 34-42.
- Dong, W. Y., Korber, M., Lopez Esguerra, V. and Bodmeier, R. (2006). "Stability of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems." J Control Release 115(2): 158-167.
- Dowling, R. H. (1973). "The enterohepatic circulation of bile acids as they relate to lipid disorders." J Clin Path 26(5): 59-67.
- Dube, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., Macneil, J., Mack, D., Patel, D. and Moher, D. (2005). "The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review." Gastroenterology 128(4 Suppl 1): S57-67.
- Dubois, P. C. A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G. A. R., Adany, R., Aromaa, A., Bardella, M. T., van den Berg, L. H., Bockett, N. A., de la Concha, E. G., Dema, B., Fehrmann, R. S. N., Fernandez-Arquero, M., Fiatal, S., Grandone, E., Green, P. M., Groen, H. J. M., Gwilliam, R., Houwen, R. H. J., Hunt, S. E., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabo, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Maki, M., Mazzilli, M. C., McCann, O. T., Mearin, M. L., Mein, C. A., Mirza, M. M., Mistry, V., Mora, B., Morley, K. I., Mulder, C. J., Murray, J. A., Nunez, C., Oosterom, E., Ophoff, R. A., Polanco, I., Peltonen, L., Platteel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, J. J., Sperandeo, M. P., Tack, G. J., Turner, G., Veldink, J. H., Verbeek, W. H. M., Weersma, R. K., Wolters, V. M., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L., Neuhausen, S. L., McManus, R., Barisani, D., Deloukas, P., Barrett, J. C., Saavalainen, P., Wijmenga, C. and van Heel, D. A. (2010). "Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression." Nat Genet 42: 295-302.

- Dufresne, M. H., Elsabahy, M. and Leroux, J. C. (2008). "Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery." Pharm Res 25(9): 2083-2093.
- Duncan, R. (2003a). "The dawning era of polymer therapeutics." Nat Rev Drug Discov 2(5): 347-360.
- Duncan, R. (2003b). "The dawning era of polymer therapeutics." Nat Rev Drug Discov 2(5): 347-60.
- Dunn, R. L., Garrett, J. S., Ravivarapu, H. and Chandrashekar, B. L. (2007). Polymeric delivery formulations of leuprolide with improved efficacy. US patent. 20070104759A1.
- Elsabahy, M., Wazen, N., Bayo-Puxan, N., Deleavey, G., Servant, M., Damha, M. J. and Leroux, J. C. (2009). "Delivery of nucleic acids through the controlled disassembly of multifunctional nanocomplexes." Adv Funct Mater 19(24): 3862-3867.
- Ertekin, V., Selimoglu, M. A., Kardas, F. and Aktas, E. (2005). "Prevalence of celiac disease in Turkish children." J Clin Gastroenterol 39(8): 689-91.
- ExPaSy. "Serveur de protéomique." Retrieved 23.02.2010, from [http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).
- Fasano, A. (2001). "Intestinal zonulin: open sesame!" Gut 49(2): 159-62.
- Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P. H., Guandalini, S., Hill, I. D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S. S., Murray, J. A. and Horvath, K. (2003). "Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study." Arch Intern Med 163(3): 286-92.
- Fasano, A. and Catassi, C. (2001). "Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum." Gastroenterology 120(3): 636-651.
- Fogueri, L. R. and Singh, S. (2009). "Smart polymers for controlled delivery of proteins and peptides: a review of patents." Recent Pat Drug Deliv Formul 3(1): 40-48.
- Garner, C. P., Murray, J., Ding, Y. C., Van Heel, D. A. and Neuhausen, S. L. (2009). "Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in US population." Hum Mol Gen 18(20): 4219-4225.
- Gaucher, G., Asahina, K., Wang, J. H. and Leroux, J. C. (2009). "Effect of poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles." Biomacromolecules 10(2): 408-416.

- Gianfrani, C., Troncone, R., Mugione, P., Cosentini, E., De Pascale, M., Faruolo, C., Senger, S., Terrazzano, G., Southwood, S., Auricchio, S. and Sette, A. (2003). "Celiac disease association with CD8+ T cell responses: identification of a novel gliadin-derived HLA-A2-restricted epitope." J Immunol 170(5): 2719-26.
- Goldsmith, D. R., Scott, L. J., Cvetkovic, R. S. and Plosker, G. L. (2008). "Sevelamer hydrochloride - A review of its use for hyperphosphataemia in patients with end-stage renal disease on haemodialysis." Drugs 68(1): 85-104.
- Gomez, J. C., Selvaggio, G. S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverria, R., Sugai, E., Vazquez, H., Maurino, E. and Bai, J. C. (2001). "Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area." Am J Gastroenterol 96(9): 2700-4.
- Greco, L. (1997). "From the neolithic revolution to gluten intolerance: benefits and problems associated with the cultivation of wheat." J Pediatr Gastroenterol Nutr 24(5): S14-6.
- Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M. G., Cotichini, R., D'Agate, C., Tinto, N., Sacchetti, L., Tosi, R. and Stazi, M. A. (2002). "The first large population based twin study of coeliac disease." Gut 50(5): 624-8.
- Green, P. H. and Cellier, C. (2007). "Celiac disease." N Engl J Med 357(17): 1731-43.
- Green, P. H. and Jabri, B. (2003). "Coeliac disease." Lancet 362(9381): 383-91.
- Grover, R., Puri, A. S., Aggarwal, N. and Sakhuja, P. (2007). "Familial prevalence among first-degree relatives of celiac disease in North India." Dig Liver Dis 39(10): 903-7.
- Haag, R. and Kratz, F. (2006). "Polymer therapeutics: Concepts and applications." Angew Chem-Int Ed 45(8): 1198-1215.
- Haines, M. L., Anderson, R. P. and Gibson, P. R. (2008). "Systematic review: the evidence base for long-term management of coeliac disease." Aliment Pharmacol Ther 28(9): 1042-1066.
- Heerze, L. D. and Armstrong, G. D. (2002). Treatment of C. difficile toxin B associated conditions US Patent 6465435
- Henderson, K. N., Tye-Din, J. A., Reid, H. H., Chen, Z., Borg, N. A., Beissbarth, T., Tatham, A., Mannering, S. I., Purcell, A. W., Dudek, N. L., van Heel, D. A., McCluskey, J., Rossjohn, J. and Anderson, R. P. (2007). "A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease." Immunity 27(1): 23-34.

- Hervas, J. G., Prados, D. and Cerezo, S. (2003). "Treatment of hyperphosphatemia with sevelamer hydrochloride in hemodialysis patients: a comparison with calcium acetate." Kidney Int Suppl(85): S69-72.
- Hider, R. C. and Canas-Rodriguez, A. (1997). "Guanidino group-containing polymers for decreasing blood phosphate levels." US Patent 5 698 190.
- Hoffenberg, E. J. (2005). "Should all children be screened for celiac disease?" Gastroenterology 128(4 Suppl 1): S98-103.
- Holmes-Farley, R. S., Mandeville, W. H., Dhal, P. K., Huval, C. C., Li, X. and Polomoscank, S. C. (2003). Aryl boronate functionalized polymers for treating obesity PCT Int Appl WO 2003002571.
- Holmes-Farley, S. R. (2005). Polymeric pharmaceuticals to treat obesity. 229<sup>th</sup> National Meeting of the American Chemical Society, San Diego, American Chemical Society.
- Hopper, A. D., Hadjivassiliou, M., Hurlstone, D. P., Lobo, A. J., McAlindon, M. E., Egner, W., Wild, G. and Sanders, D. S. (2008). "What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis." Clin Gastroenterol Hepatol 6(3): 314-20.
- Hue, S., Mention, J. J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N. and Caillat-Zucman, S. (2004). "A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease." Immunity 21(3): 367-77.
- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L. C., Ryan, A. W., Panesar, D., Gwilliam, R., Takeuchi, F., McLaren, W. M., Holmes, G. K., Howdle, P. D., Walters, J. R., Sanders, D. S., Playford, R. J., Trynka, G., Mulder, C. J., Mearin, M. L., Verbeek, W. H., Trimble, V., Stevens, F. M., O'Morain, C., Kennedy, N. P., Kelleher, D., Pennington, D. J., Strachan, D. P., McArdle, W. L., Mein, C. A., Wapenaar, M. C., Deloukas, P., McGinnis, R., McManus, R., Wijmenga, C. and van Heel, D. A. (2008). "Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response." Nat Genet 40(4): 395-402.
- Huval, C. C., Chen, X., Holmes-Farley, S. R., Mandeville, W. H., Polomoscank, S. C., Sacchiero, R. J. and Dhal, P. K. (2004). Molecularly imprinted bile acid sequestrants: Synthesis and biological studies. Molecularly Imprinted Materials-2003, Boston. P. Kofinas, B. Sellergren and M. J. Roberts. 787: 85-90.
- Insull, W., Jr. (2006). "Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review." South Med J 99(3): 257-73.

- Insull, W., Jr., Marquis, N. R. and Tsianco, M. C. (1991). "Comparison of the efficacy of Questran Light, a new formulation of cholestyramine powder, to regular Questran in maintaining lowered plasma cholesterol levels." Am J Cardiol 67(6): 501-5.
- Intra, J. and Salem, A. K. (2010). "Fabrication, characterization and in vitro evaluation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles Lloaded with polyamidoamine-plasmid DNA dendriplexes for applications in nonviral gene delivery." J Pharm Sci 99(1): 368-384.
- Jabri, B. and Sollid, L. M. (2006). "Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 3(9): 516-25.
- Johannsson, G. F., Kristjansson, G., Cariglia, N. and Thorsteinsson, V. (2009). "The prevalence of celiac disease in blood donors in Iceland." Dig Dis Sci 54(2): 348-50.
- Jones, M. C., Gao, H. and Leroux, J. C. (2008). "Reverse polymeric micelles for pharmaceutical applications." J Control Release 132(3): 208-215.
- Joo, M., Bae, W. K., Kim, N. H. and Han, S. R. (2009). "Colonic mucosal necrosis following administration of calcium polystyrene sulfonate (Kalimate) in a uremic patient." J of Korean Med Sci 24(6): 1207-1211.
- Jozefiak, T. H., Mandeville, W. H., Holmes-Farley, S. R., Arbeeny, C., Huval, C. C., Sacchiero, R., Concagh, D., Yang, K. W. and Maloney, C. (2001). Synthetic polymers for the binding of fat in the intestinal tract. National Meeting of the American Chemical Society, American Chemical Society.
- Katopodis, K. P., Andrikos, E. K., Gouva, C. D., Bairaktari, E. T., Nikolopoulos, P. M., Takouli, L. K., Tzallas, C. S., Elisaf, M. S., Pappas, M. V. and Siamopoulos, K. C. (2006). "Sevelamer hydrochloride versus aluminum hydroxide: effect on serum phosphorus and lipids in CAPD patients." Perit Dial Int 26(3): 320-7.
- Kaukinen, K., Collin, P., Laurila, K., Kaartinen, T., Partanen, J. and Mäki, M. (2007a). "Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit." Scand J Gastroenterol 42(12): 1428 - 1433.
- Kaukinen, K., Collin, P., Laurila, K., Kaartinen, T., Partanen, J. and Maki, M. (2007b). "Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit." Scand J Gastroenterol: 1-6.
- Kitov, P. I., Mulvey, G. L., Griener, T. P., Lipinski, T., Solomon, D., Paszkiewicz, E., Jacobson, J. M., Sadowska, J. M., Suzuki, M., Yamamura, K. I., Armstrong, G. D. and Bundle, D. R. (2008). "In vivo supramolecular templating enhances the activity of multivalent ligands: A potential therapeutic against the Escherichia coli O157 AB(5) toxins." Proc Natl Acad Sci U S A 105(44): 16837-16842.

- Kitov, P. I., Sadowska, J. M., Mulvey, G., Armstrong, G. D., Ling, H., Pannu, N. S., Read, R. J. and Bundle, D. R. (2000). "Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands." Nature 403(6770): 669-672.
- Korponay-Szabo, I. R., Szabados, K., Pusztai, J., Uhrin, K., Ludmany, E., Nemes, E., Kaukinen, K., Kapitany, A., Koskinen, L., Sipka, S., Imre, A. and Maki, M. (2007). "Population screening for coeliac disease in primary care by district nurses using a rapid antibody test: diagnostic accuracy and feasibility study." BMJ 335(7632): 1244-7.
- Lammers, K. M., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S., Netzel-Arnett, S., Antalis, T., Vogel, S. N. and Fasano, A. (2008). "Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3." Gastroenterology 135(1): 194-204 e3.
- Leroux, J. C. (2007). "Injectable nanocarriers for biodetoxification." Nature Nanotech 2(11): 679-684.
- Louie, T. J., Peppe, J., Watt, C. K., Johnson, D., Mohammed, R., Dow, G., Weiss, K., Simon, S., John, J. F., Jr., Garber, G., Chasan-Taber, S. and Davidson, D. M. (2006). "Tolvamer, a novel nonantibiotic polymer, compared with vancomycin in the treatment of mild to moderately severe *Clostridium difficile*-associated diarrhea." Clin Infect Dis 43(4): 411-20.
- Ludvigsson, J. F., Montgomery, S. M., Ekbom, A., Brandt, L. and Granath, F. (2009). "Small-intestinal histopathology and mortality risk in celiac disease." JAMA 302(11): 1171-1178.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S. and Londei, M. (2003). "Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease." Lancet 362(9377): 30-7.
- Maki, M., Mustalahti, K., Kokkonen, J., Kulmala, P., Haapalahti, M., Karttunen, T., Ilonen, J., Laurila, K., Dahlbom, I., Hansson, T., Hopfl, P. and Knip, M. (2003). "Prevalence of celiac disease among children in Finland." N Engl J Med 348(25): 2517-24.
- Malamut, G., Afchain, P., Verkarre, V., Lecomte, T., Amiot, A., Damotte, D., Bouhnik, Y., Colombel, J. F., Delchier, J. C., Allez, M., Cosnes, J., Lavergne-Slove, A., Meresse, B., Trinquart, L., Macintyre, E., Radford-Weiss, I., Hermine, O., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N. and Cellier, C. (2009a). "Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II." Gastroenterology 136(1): 81-90.



- Malamut, G., Meresse, B., Cellier, C. and Cerf-Bensussan, N. (2009b). "Celiac disease in 2009: A future without gluten-free diet?" Gastroenterol Clin Biol 33(8-9): 635-647.
- Mandeville, W. H. (2000). "New generation of non-absorbed, lipid lowering polymers." Abstracts of Papers of the American Chemical Society 220: 252-POLY.
- Mandeville, W. H. (2005). Scale-up, manufacturing and clinical investigation of the anti-obesity product, GT389-255. 229<sup>th</sup> National Meeting of the American Chemical Society, San Diego.
- Mandeville, W. H. and Garigapati, V. R. (1997). Acid-functionalized saccharides as polyvalent anti-infectives. US patent. 5700458
- Mandeville, W. H., Neenan, T. X. and Holmes-Farley, R. S. (1998). Ionic polymers as anti-infective agents. US patent. 6034129.
- Masuda, S. and Kitagawa, M. (2006). "Colon necrosis in uremic patient due to calcium polystyrene sulfonate (Kalimate and Argamate Jelly)." Mod Pathol 19: 66-66.
- Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Menard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., Bouhnik, Y., Lamarque, D., Chaussade, S., Malamut, G., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Monteiro, R. C. and Heyman, M. (2008). "Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease." J Exp Med 205(1): 143-154.
- McGowan, C. E., Saba, S., Chu, G., Resnick, M. B. and Moss, S. E. (2008). "Intestinal ischemia due to sodium polystyrene sulfonate (kayexalate) in sorbitol: Not just in the very ill." Gastroenterology 134(4): A216-A216.
- McGowan, C. E., Saha, S., Chu, G., Resnick, M. B. and Moss, S. F. (2009). "Intestinal necrosis due to sodium polystyrene sulfonate (Kayexalate) in sorbitol." South Med J 102(5): 493-497.
- Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Nenna, R., Maiella, G., Lulli, P. and Mazzilli, M. C. (2009). "HLA-DQ and risk gradient for celiac disease." Hum Immunol 70(1): 55-59.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulet, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C., Green, P. H. and Jabri, B. (2004). "Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease." Immunity 21(3): 357-66.
- Molineux, G. (2003). "Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients." Anticancer Drugs 14(4): 259-64.

- Monsuur, A. J., de Bakker, P. I., Alizadeh, B. Z., Zhernakova, A., Bevova, M. R., Strengman, E., Franke, L., Van't Slot, R., Van Belzen, M. J., Lavrijsen, I. C., Diosdado, B., Daly, M. J., Mulder, C. J., Mearin, M. L., Meijer, J. W., Meijer, G. A., van Oort, E., Wapenaar, M. C., Koeleman, B. P. and Wijmenga, C. (2005). "Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect." Nat Genet 37(12): 1341-4.
- Montagnac, R., Mehaut, S. and Schillinger, F. (2009). "Digestive adverse effects due to sodium polystyrene sulfonate (Kayexalate (R)) in dialysis patients." Nephrol Ther 5(3): 214-216.
- Mora, S., Barera, G., Beccio, S., Proverbio, M. C., Weber, C., Bianchi, C. and Chiumello, G. (1999). "Bone density and bone metabolism are normal after long-term gluten-free diet in young celiac patients." Am J Gastroenterol 94(2): 398-403.
- Mulvey, G. L., Marcato, P., Kitov, P. I., Sadowska, J., Bundle, D. R. and Armstrong, G. D. (2003). "Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands." J Infect Dis 187(4): 640-649.
- Murray, J. A., Moore, S. B., Van Dyke, C. T., Lahr, B. D., Dierkhising, R. A., Zinsmeister, A. R., Melton, L. J., 3rd, Kroning, C. M., El-Yousseff, M. and Czaja, A. J. (2007). "HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease." Clin Gastroenterol Hepatol 5(12): 1406-12.
- Murray, J. A., Van Dyke, C., Plevak, M. F., Dierkhising, R. A., Zinsmeister, A. R. and Melton, L. J., 3rd (2003). "Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001." Clin Gastroenterol Hepatol 1(1): 19-27.
- Myleus, A., Ivarsson, A., Webb, C., Danielsson, L., Hernell, O., Hogberg, L., Karlsson, E., Lagerqvist, C., Norstrom, F., Rosen, A., Sandstrom, O., Stenhammar, L., Stenlund, H., Wall, S. and Carlsson, A. (2009). "Celiac disease revealed in 3% of swedish 12-year-olds born during an epidemic." J Pediatr Gastroenterol Nutr 49(2): 170-176.
- Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. and Kataoka, K. (2001). "Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin." J Control Release 74(1-3): 295-302.
- Nenna, R., Mora, B., Megjorni, F., Mazzilli, M. C., Magliocca, F. M., Tiberti, C. and Bonamico, M. (2008). "HLA-DQB1\*02 dose effect on RIA anti-tissue transglutaminase autoantibody levels and clinicopathological expressivity of celiac disease." J Pediatr Gastroenterol Nutr 47(3): 288-292.
- Nistico, L., Fagnani, C., Coto, I., Percopo, S., Cotichini, R., Limongelli, M. G., Paparo, F., D'Alfonso, S., Giordano, M., Sferlazzas, C., Magazzu, G., Momigliano-Richiardi, P., Greco, L. and Stazi, M. A. (2006). "Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins." Gut 55(6): 803-8.

- Ocmant, A. and Mascart, F. (2007). "Effective detection of celiac disease using salivary anti-transglutaminase." Am J Med 120(10): e15-e15.
- Oliveira, R. P., Sdepanian, V. L., Barreto, J. A., Cortez, A. J., Carvalho, F. O., Bordin, J. O., de Camargo Soares, M. A., da Silva Patricio, F. R., Kawakami, E., de Moraes, M. B. and Fagundes-Neto, U. (2007). "High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody." Eur J Gastroenterol Hepatol 19(1): 43-9.
- Önen, F. E., Lofgreen, J., Ozinb, G. A. and Leroux, J. C. (2009). A molecularly imprinted polymer for diltiazem biodegradation. 16<sup>th</sup> European Symposium on Organic Chemistry, Prague.
- Pais, W., Duerksen, D., Pettigrew, N. and Bernstein, C. N. (2007). "How many duodenal biopsies are required to make a diagnosis of celiac disease?" Gastroenterology 132(4): A350-A350.
- Peppe, J., Porzio, A. and Davidson, D. M. (2008). "A new formulation of tolevamer, a novel nonantibiotic polymer, is safe and well-tolerated in healthy volunteers: a randomized phase I trial." Br J Clin Pharmacol 66(1): 102-9.
- Perez-Marrero, R. and Tyler, R. C. (2004). "A subcutaneous delivery system for the extended release of leuprolide acetate for the treatment of prostate cancer." Exp Opin Pharmacother 5(2): 447-457.
- Peters, U., Askling, J., Gridley, G., Ekbom, A. and Linet, M. (2003). "Causes of death in patients with celiac disease in a population-based Swedish cohort." Arch Intern Med 163(13): 1566-72.
- Polomoscank, S. C., Cannon, C. P., Neenan, T. X., Holmes-Farley, S. R., Mandeville, W. H. and Dhal, P. K. (2005). "Hydroxamic acid-containing hydrogels for nonabsorbed iron chelation therapy: Synthesis, characterization, and biological evaluation." Biomacromolecules 6(6): 2946-2953.
- Pouponneau, P., Leroux, J. C. and Martel, S. (2009). "Magnetic nanoparticles encapsulated into biodegradable microparticles steered with an upgraded magnetic resonance imaging system for tumor chemoembolization." Biomaterials 30(31): 6327-6332.
- Qunibi, W. J. (2009). "New Phosphate Binders on the Horizon." Renal and urology news.
- Rashtak, S., Ettore, M. W., Homburger, H. A. and Murray, J. A. (2008). "Comparative Usefulness of Deamidated Gliadin Antibodies in the Diagnosis of Celiac Disease." Clin Gastroenterol Hepatol 6(4): 426-432.
- Ravikumara, M., Nootigattu, V. K. and Sandhu, B. K. (2007). "Ninety percent of celiac disease is being missed." J Pediatr Gastroenterol Nutr 45(4): 497-9.

- Ress, K., Harro, M., Maaroos, H. I., Harro, J., Uibo, R. and Uibo, O. (2006). "High prevalence of coeliac disease: Need for increasing awareness among physicians." Dig Liver Dis.
- Rossi, N. A. A., Mustafa, I., Jackson, J. K., Burt, H. M., Horte, S. A., Scott, M. D. and Kizhakkedathu, J. N. (2009). "In vitro chelating, cytotoxicity, and blood compatibility of degradable poly(ethylene glycol)-based macromolecular iron chelators." Biomaterials 30(4): 638-648.
- Rubio-Tapia, A., Kelly, D. G., Lahr, B. D., Dogan, A., Wu, T. T. and Murray, J. A. (2009). "Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience." Gastroenterology 136(1): 99-107.
- Rutz, R., Ritzler, E., Fierz, W. and Herzog, D. (2002). "Prevalence of asymptomatic celiac disease in adolescents of eastern Switzerland." Swiss Med Wkly 132(3-4): 43-7.
- Schumann, M., Richter, J. F., Wedell, I., Moos, V., Zimmermann-Kordmann, M., Schneider, T., Daum, S., Zeitz, M., Fromm, M. and Schulzke, J. D. (2008). "Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue." Gut 57(6): 747-54.
- Shahbazkhani, B., Malekzadeh, R., Sotoudeh, M., Moghadam, K. F., Farhadi, M., Ansari, R., Elahyfar, A. and Rostami, K. (2003). "High prevalence of coeliac disease in apparently healthy Iranian blood donors." Eur J Gastroenterol Hepatol 15(5): 475-478.
- Shan, L., Mathews, I. I. and Khosla, C. (2005). "Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity." Proc Natl Acad Sci U S A 102(10): 3599-604.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M. and Khosla, C. (2002). "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue." Science 297(5590): 2275-9.
- Siegel, M., Strnad, P., Watts, R. E., Choi, K., Jabri, B., Omary, M. B. and Khosla, C. (2008). "Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury." PLoS ONE 3(3): e1861.
- Sigal, G. B., Mammen, M., Dahmann, G. and Whitesides, G. M. (1996). "Polyacrylamides bearing pendant alpha-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus: The strong inhibition reflects enhanced binding through cooperative polyvalent interactions." J Am Chem Soc 118(16): 3789-3800.
- Simard, P. and Leroux, J. C. (2009). "pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells." Int J Pharm 381(2): 86-96.

- Simpson, L. S., Burdine, L., Dutta, A. K., Feranchak, A. P. and Kodadek, T. (2009). "Selective toxin sequestrants for the treatment of bacterial infections." J Am Chem Soc 131(16): 5760-5764.
- Slatopolsky, E. A., Burke, S. K. and Dillon, M. A. (1999). "RenaGel (R), a nonabsorbed calcium- and aluminum-free phosphate binder, lowers serum phosphorus and parathyroid hormone." Kidney International 55(1): 299-307.
- Sollid, L. M. (2000). "Molecular basis of celiac disease." Annu Rev Immunol 18: 53-81.
- Sollid, L. M. (2002). "Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder." Nat Rev Immunol 2(9): 647-55.
- Sollid, L. M. and Lie, B. A. (2005). "Celiac disease genetics: current concepts and practical applications." Clin Gastroenterol Hepatol 3(9): 843-51.
- Staels, B. (2009). "A review of bile acid sequestrants: Potential mechanism(s) for glucose-lowering effects in type 2 diabetes Mellitus." Postgrad Med: 25-30.
- Tack, G. J., Verbeek, W. H., Schreurs, M. W. and Mulder, C. J. (2010). "The spectrum of celiac disease: Epidemiology, clinical aspects and treatment." Nat Rev Gastroenterol Hepatol online publication doi:10.1038.2010.23.
- Thomas, A., James, B. R. and Landsberg, D. (2009). "Colonic necrosis due to oral Kayexalate in a critically-ill Patient." Am J Med Sci 337(4): 305-306.
- Thomas, K. E., Sapone, A., Fasano, A. and Vogel, S. N. (2006). "Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease." J Immunol 176(4): 2512-21.
- Thomas, R. C., Hsi, R. S., Harpootlian, H., Johnson, T. D. and Judy, R. W. (1978). "Preparation of [<sup>14</sup>C]colestipol hydrochloride and its disposition in the human, dog and rat." Atherosclerosis 29(1): 9-23.
- Trottier, V., Drolet, S. and Morcos, M. W. (2009). "Ileocolic perforation secondary to sodium polystyrene sulfonate in sorbitol use: A case report." Can J Gastroenterol 23(10): 689-690.
- Tziomalos, K., Athyros, V. G. and Mikhailidis, D. P. (2009). "Colesevelam improves glycemic control and lipid management in inadequately controlled type 2 diabetes mellitus." Nat Clin Pract Endocrinol Metab 5(1): 16-17.
- Vader, L. W., Stepniak, D. T., Bunnik, E. M., Kooy, Y. M., de Haan, W., Drijfhout, J. W., Van Veelen, P. A. and Koning, F. (2003a). "Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains." Gastroenterology 125(4): 1105-13.

- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., Van Rood, J. J., Spaenij, L. and Koning, F. (2003b). "The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A 100(21): 12390-5.
- Van De Kamer, J. H., Weijers, H. A. and Dicke, W. K. (1953). "Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease." Acta Paediatr 42(3): 223-31.
- Van Heel, D. A. and West, J. (2006). "Recent advances in coeliac disease." Gut 55(7): 1037-1046.
- Van Hest, J. C. M. (2007). "Biosynthetic-synthetic polymer conjugates." Polymer Reviews 47(1): 63-92.
- Vasey, P. A., Kaye, S. B., Morrison, R., Twelves, C., Wilson, P., Duncan, R., Thomson, A. H., Murray, L. S., Hilditch, T. E., Murray, T., Burtles, S., Fraier, D., Frigerio, E. and Cassidy, J. (1999). "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents "Drug-Polymer Conjugates." Clin Cancer Res 5(1): 83-94.
- Vicent, M. J., Dieudonne, L., Carbajo, R. J. and Pineda-Lucena, A. (2008). "Polymer conjugates as therapeutics: future trends, challenges and opportunities." Exp Opin Drug Deliv 5(5): 593-614.
- Vicent, M. J., Ringsdorf, H. and Duncan, R. (2009). "Polymer therapeutics: Clinical applications and challenges for development Preface." Adv Drug Deliv Rev 61(13): 1117-1120.
- Walkersmith, J. A., Guandalini, S., Schmitz, J., Shmerling, D. H. and Visakorpi, J. K. (1990). "Revised criteria for diagnosis of celiac-disease." Arch Dis Child 65(8): 909-11.
- Wapenaar, M. C., Monsuur, A. J., Van Bodegraven, A. A., Weersma, R. K., Bevova, M. R., Linskens, R. K., Howdle, P., Holmes, G., Mulder, C. J., Dijkstra, G., Van Heel, D. A. and Wijmenga, C. (2008). "Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis." Gut 57(4): 463-7.
- Weiss, K. (2009). "Toxin-binding treatment for Clostridium difficile: a review including reports of studies with tolevamer." Int J Antimicrob Agents 33(1): 4-7.
- West, J., Logan, R. F., Hill, P. G., Lloyd, A., Lewis, S., Hubbard, R., Reader, R., Holmes, G. K. and Khaw, K. T. (2003). "Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England." Gut 52(7): 960-5.

- Williams, K. B., Barycka, K., Zella, J. B. and DeLuca, H. F. (2009). "Diaminobutane (DAB) dendrimers are potent binders of oral Phosphate." J Bone Miner Res 24(1): 97-101.
- Yellepeddi, V. K., Kumar, A. and Palakurthi, S. (2009). "Biotinylated poly(amido)amine (PAMAM) dendrimers as carriers for drug delivery to ovarian cancer cells in vitro." Anticancer Res 29(8): 2933-2943.
- Ying, G., Sigurdur, Y. K., Lynn, R. G., Magnus, B. r., Neil, E. C. and Ola, L. (2009). "Increased risk for non-Hodgkin lymphoma in individuals with celiac disease and a potential familial association." Gastroenterology 136(1): 91-98.
- Zhou, T., Le Kong, X., Liu, Z. D., Liu, D. Y. and Hider, R. C. (2008). "Synthesis and iron(III)-chelating properties of novel 3-hydroxypyridin-4-one hexadentate ligand-containing copolymers." Biomacromolecules 9(5): 1372-1380.
- Zhou, T., Liu, Z. D., Neubert, H., Le Kong, X., Ma, Y. M. and Hider, R. C. (2005). "High affinity iron(III) scavenging by a novel hexadentate 3-hydroxypyridin-4-one-based dendrimer: Synthesis and characterization." Bioorg Med Chem Lett 15(22): 5007-5011.
- Zhou, T., Neubert, H., Liu, D. Y., Liu, Z. D., Ma, Y. M., Le Kong, X., Luo, W., Mark, S. and Hider, R. C. (2006). "Iron binding dendrimers: A novel approach for the treatment of haemochromatosis." J Med Chem 49(14): 4171-4182.

## **4 Revue: Prevention measures and exploratory pharmacological treatments of celiac disease**

Maud Pinier, Pharm D, MSc<sup>1\*</sup>, Gregor Fuhrmann, Pharm D<sup>2\*</sup>, Elena F. Verdu, MD, PhD<sup>3</sup>  
and Jean-Christophe Leroux, B Pharm, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, <sup>2</sup>Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland, <sup>3</sup>Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, Canada.

\*These authors contributed equally to this manuscript

Published in American Journal of Gastroenterology, 2010, 105(12):2551-61.



## 4.1 Abstract

Increasing prevalence, protean clinical manifestations and lack of pharmacological therapy make celiac disease (CD) a complex and highly relevant illness in gastroenterology. This chronic inflammatory disorder of the small intestine is caused by the ingestion of cereal gluten in genetically susceptible individuals, leading to a variety of gastrointestinal and non-gastrointestinal manifestations. Awareness among physicians is growing due to accessible and highly accurate diagnostic and screening methods. Recent evidence suggests a possible rising incidence of CD. Environmental factors such as early life gluten exposure, intestinal infections, short duration of breast-feeding, and changes in intestinal microbiota have been proposed to play a role in CD pathogenesis. Thus, prevention approaches to diminish the rising prevalence of CD are currently being evaluated. Still, the cornerstone treatment of CD remains a strict gluten-free diet. This nutritional regime is demanding, and non-adherence is common because of social isolation, financial issues or restriction of food diversity. Allowing patients to occasionally consume small amounts of gluten would greatly improve their quality of life. Owing to recent advances in the understanding of the pathogenesis of CD, different targets have been identified and have motivated the development of several experimental therapeutic strategies. The main goal of this review is to discuss the mechanisms that can be exploited therapeutically to prevent or delay CD, disease associations and its complications. Current treatments for complications of celiac disease, including refractory celiac disease and malignancy, are beyond the scope of this review.

## 4.2 Introduction

Ingestion of gluten-containing dietary cereals (Figure 1-16) triggers celiac disease (CD) in genetically-susceptible individuals. Genetic predisposition is conferred by Human Leukocyte Antigens (HLA) as 90-95% of affected people exhibit HLA-DQ2 molecules and the remainder, HLA-DQ8 (1). CD is a common disorder worldwide. Its prevalence is as high as 0.5 to 1% (2), but recent findings indicate that it has increased substantially in American and Finnish populations in recent years (3, 4). The increment in prevalence

cannot only be explained by improved diagnostic approaches, and the involvement of environmental factors such as breast-feeding, time of gluten introduction and infections, in CD pathogenesis have been suggested (5-8).

Both the pathology and the clinical spectrum of CD can vary considerably from severe to subtle, and the clinical expression is not necessarily restricted to the presence of intestinal atrophy (2, 9). Classical gastrointestinal (GI) manifestations include diarrhea, abdominal bloating and discomfort and perturbation of bowel habits (2, 10). However, many patients have unrecognized CD (11, 12) due, in part, to absence of symptoms (silent CD) or extra-intestinal clinical presentations (13, 14). Complications of CD include refractory CD, a complex disorder with severe and recurrent symptoms that is unresponsive to at least six months of strict adherence to a gluten-free diet (GFD) (12). Few patients with nonresponsive CD develop enteropathy-associated T-cell lymphoma (EATL) (15, 16), a complication of CD that requires drug-based therapies (12). The prevalence of this rare disorder is about 0.5-1/1.000.000 (17). CD also is often associated with other autoimmune disorders such as autoimmune thyroiditis and Type 1 diabetes (T1D) (13, 18). The prevalence of CD among siblings of children with Type I diabetes has been shown to correlate with the prevalence of CD-associated HLA-DQB1 alleles (19). Moreover, the risk of CD in children with type 1 diabetes is significantly modified by the presence of HLA-DQB1\*02-DQA1\*05 (20). A recent genotyping study that enrolled 8064 T1D patients and 9339 control subjects showed that patients with T1D and CD express seven common alleles that regulate autoimmune responses (21).

Therefore, early prevention of CD may represent a cost effective strategy since the disease is highly prevalent. Indeed, mortality rates in celiac patients fluctuate between studies and European countries, but overall mortality is higher than in the general population (22). Recent data also confirm an elevated risk of mortality in individuals with mild gluten-induced inflammation without villous atrophy (9). The impact of preventing CD on refractory CD and EATL remains to be determined.

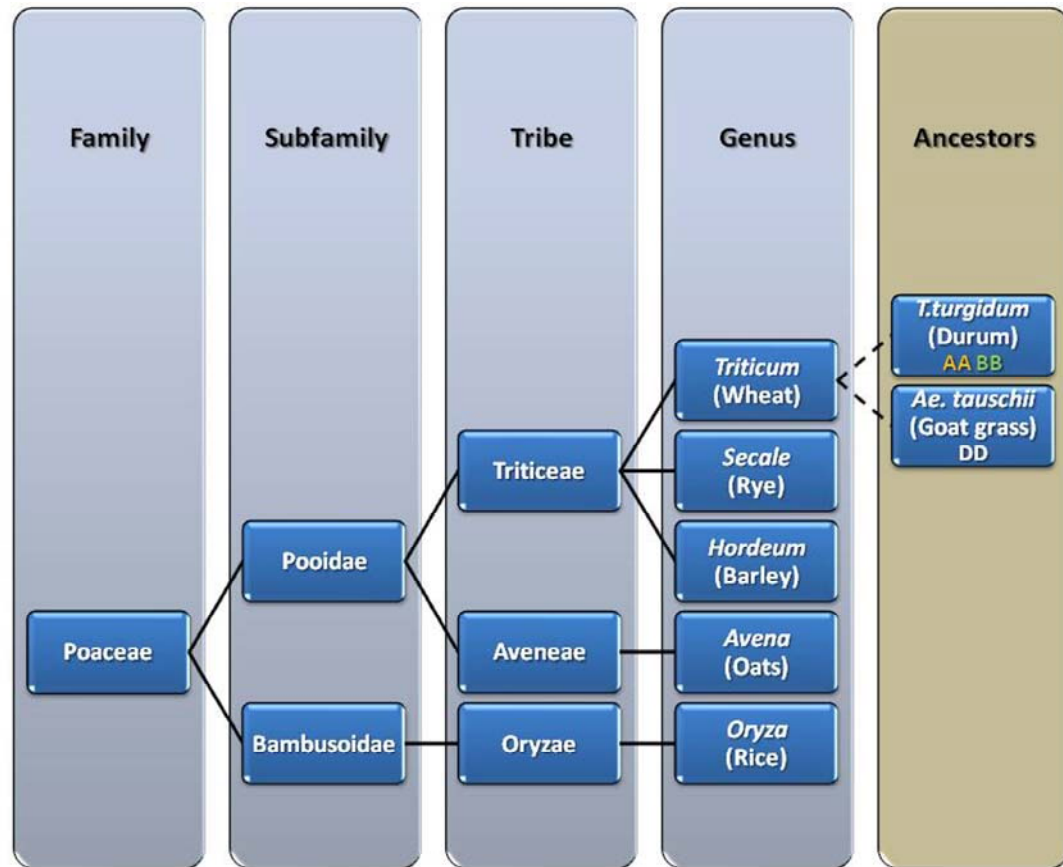


Figure 1- 16. The phylogeny of wheat.

Genealogy of selected grains belonging to the *Poaceae* family (true grasses). Besides gluten, which is the disease-triggering protein fraction in wheat, other related toxic proteins are found in barley (hordeins) and rye (secalins) (138). This can be explained by their taxonomic ancestry deriving from the *Triticeae* tribe, while oats (with avenin as corresponding protein fraction) – though originating from the same subfamily (*Pooidae*) – are more distantly related (139). This figure also displays ancestors of today's *Triticum* varieties. Hybridization with the D genome donor *Aegilops tauschii* (goat grass) presumably introduced gluten T-cell reactive sequences into the *Triticum* genus. Indeed, ancient di- and tetraploid wheat species display reduced T-cell immunotoxicity compared to today's plants while gluten digests from *Ae. tauschii* contain all commonly known epitopes involved in CD (140).

### 4.3 Gluten peptides trigger celiac disease

CD is the only known autoimmune disease in which the trigger, gluten, has been identified. Gluten is the major storage protein fraction in wheat and one of the most common ingredients in human nutrition. The average gluten intake from a Western diet is

typically about 20 g/day. Generally, gluten can be separated into polymeric (glutenin) and monomeric (gliadin) fractions. Though glutenins are frequently recognized as *ex vivo* inflammatory triggers in celiac biopsies (11), gliadin fractions play a predominant role. Their uniquely high proline and glutamine content makes them resistant to digestive enzymes (23) (Figure 1-17). Incomplete gliadin cleavage in the upper small intestine generates peptides that are transported through the mucosal barrier, inducing inflammation in the *lamina propria*. Specific deamidation of gliadin peptides by tissue transglutaminase 2 (tTG2) (24) introduces negative charges that increase the peptide's affinity for disease-associated human leukocyte antigen (HLA)-DQ2/8 molecules (25). Subsequently, activated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes contribute to inflammation through secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , IL-18, IFN- $\alpha$  and IL-21 (26-28) (Figure 1-17). Many specific peptides have been reported to trigger the inflammatory reaction in CD. Among them, the 33-mer (p57-89 of  $\alpha$ 2-gliadin), contains at least three immunogenic epitopes (*e.g.* 13mer p62-75), recognized by most, if not all, T-cells from CD patients (23) (Figure 1-17). Certainly, the 33-mer may be highly immunogenic, but it is only one of many harmful structures in gliadin that have been identified so far. For example, the non-immunodominant p31-43, found in  $\alpha$ -gliadin, has been shown to stimulate the innate immune response (29) (Figure 1-17).

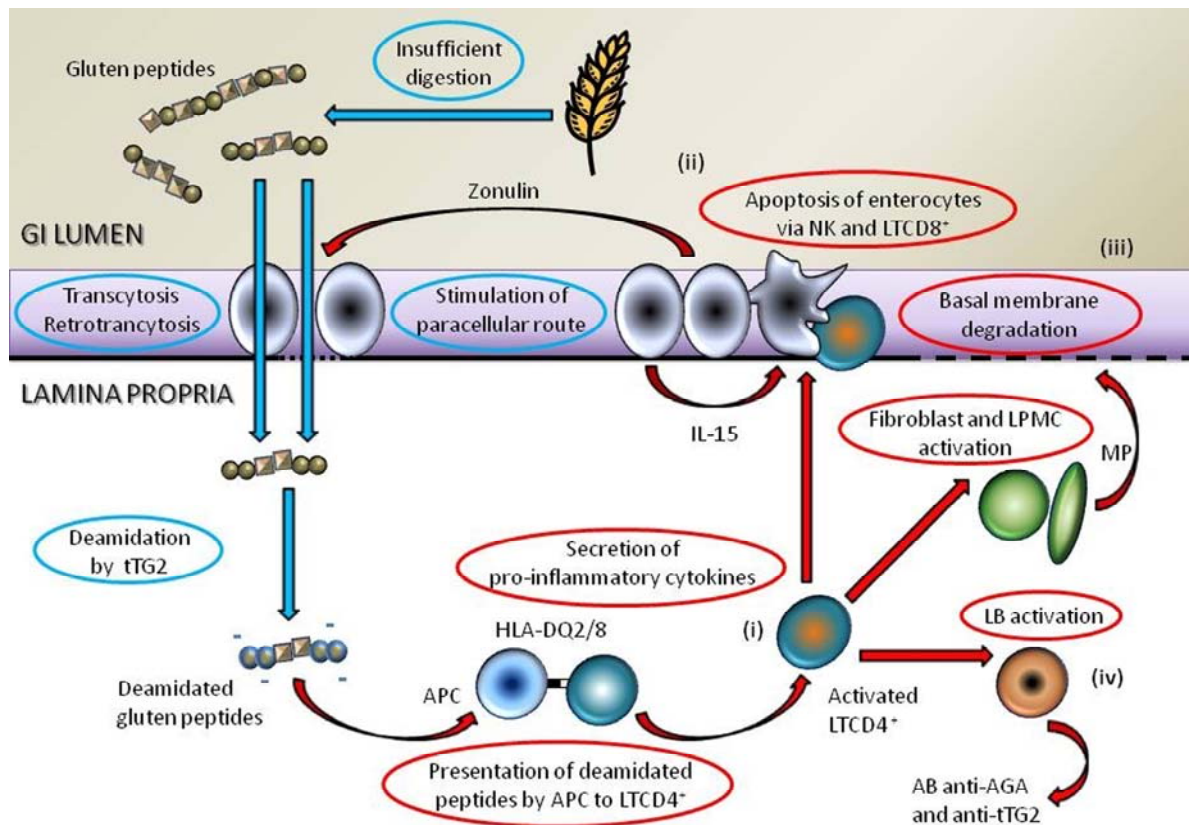


Figure 1- 17. Current concept of the pathophysiology of celiac disease.

Gluten fragments are highly resistant to digestion by gastro-pancreatic and brush border membrane proteases and peptidases (23). Smaller peptides are produced upon incomplete processing in the upper part of the small intestine. The paracellular route can be impaired by zonulin-induced opening of tight junctions (92). There is also evidence that gliadin-fragment transport can occur by direct transcytosis (98) and by a transferrin receptor-mediated transcytosis mechanism (*i.e.* retrotranscytosis) (93). Gluten peptides can gain access to the mucosa *via* these pathways. In the *lamina propria*, the peptides are recognized by tissue transglutaminase type 2 (tTG2) followed by regioselective deamidation, converting its glutamine residues into glutamate. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes (LTCD4<sup>+</sup>) recognize deamidated peptides in the context of human leukocyte antigen (HLA)-DQ2 and DQ8 receptors. Subsequently, the activation of CD4<sup>+</sup> T-cells leads to the release of pro-inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-21, IL-18, IL-6 that cause severe inflammation (26, 27)(i). Interleukin-15 (IL-15) released by enterocytes promotes epithelial cell apoptosis triggered by migration of inflammatory cells (CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes (LTCD8<sup>+</sup>) and natural killer cells (NK)) into the epithelium (27) (ii). Additionally, intestinal wall injury occurs due to the activity of metalloproteases (MP) secreted by fibroblasts and lamina propria mononuclear cells (LPMC) (iii). Finally, the activation of B-lymphocytes (LB) by IFN- $\gamma$  leads to the secretion of antibodies against gliadin (anti-gliadin antibodies, AGA) and against tTG2 (anti-tTG2) (27) (iv).

#### **4.4 Prevention of celiac disease**

Since pharmacological treatments of CD are not yet available, preventive measures (Box 1) are regarded as potential options to reduce the incidence of the disease. Early infant nutritional regimes were first examined to determine the impact of diet on the breakdown of oral tolerance to gluten. A meta-analysis of observational studies carried out from 1966 to 2004, concluded that breast-feeding was beneficial in preventing the development of CD (5). Children with CD are usually breast-fed less or for a shorter period of time than healthy children (30). Ongoing breast-feeding, at the time of dietary gluten introduction, has been associated with a decreased risk of CD (5). However, it is unclear whether breast-feeding delays the onset of CD and whether the protective effect is long-lasting throughout life (5). Secretory immunoglobulin A, epithelial growth factors, and immune cells secreted into breast milk might increase oral tolerance and protect infants from gastroenteritis, which has been known to favor immunogenic reactions (31). Other factors such as intestinal microbiota differences between formula- and breast-fed newborns may also play a role (32). It is well known that the intestinal microbiota impacts the integrity and maturation of the gut immune system (33) and may therefore modulate immune host responses to dietary antigens (34, 35). Finally, the observed protective effect of breast-feeding on the reduced incidence of CD may be a consequence of a lower amount of gluten exposure due to a delay in the introduction of formula in breast-fed neonates (36). The timing of gluten introduction in the diet seems also important in the pathogenesis of CD. An optimal window (between 4 and 7 months) for dietary gluten introduction, when tolerogenic responses may be promoted, has been suggested (6, 37). Moreover, breast-feeding during this “tolerance window” may protect genetically-predisposed individuals from developing CD (38).

Box 1. Facts and factors in the prevention of Celiac disease. Can early awareness help?

**Breast-feeding**

- CD prevalence is significantly reduced (~50%) when infants are breast-fed at gluten introduction (5).
- The risk of developing CD decreases by 63% in children breast-fed for more than 2 months (30).
- The mechanism of protection is not yet elucidated.
- Duration of the effect is still unclear. Long-term prospective studies are required to assess whether protection is permanent.

**Timing of gluten introduction**

- Age at first gluten exposure appears to affect CD onset (6, 37).
- Continuing breast-feeding with slow gluten introduction could be beneficial.
- Avoiding early (< 4 months) and late (> 7 months) introduction of gluten is recommended (38).

**Viral infections**

- High frequency of rotavirus infection appears to be correlated with increased risk of CD in predisposed individuals (7).
- A peptide recognized by Igs of CD patients shares homology with a rotavirus protein (VP-7) (8).
- A seasonal pattern of CD is observed with an increased risk of CD in summer-born children (42).
- The role of infection in CD pathogenesis and possible preventive immunization methods should be further investigated.

**Microflora and probiotics**

- CD patients have modified intestinal microflora (48).
- Probiotics may balance microbiota composition and modulate the immune response (39).

Despite exposure to gluten and genetic predisposition in 30% of the population, not all susceptible individuals will develop CD. Additional factors, such as gastroenteritis episodes in childhood, have been suggested to be involved in its pathogenesis (Box-1). A

prospective study reported a relationship between the frequency of rotavirus-positive serology and the occurrence of CD (7). Molecular mimicry was proposed to explain the rotavirus and CD linkage (8). Moreover, inflammatory cytokines released during viral intestinal infections, may favor antigen penetration into the mucosa (39). Inflammation also triggers the release and the activation of tTG (40, 41), which is critical in CD pathogenesis. The viral hypothesis is supported by epidemiological observations suggesting a seasonal influence on CD development (42). Other pathogens may also increase the risk of CD (43-45). Therefore, the impact of prevention of early life infection through vaccination strategies or probiotics (46) in the development of CD should be investigated.

The intestinal microbiota has been implicated in the pathogenesis of inflammatory disorders of the GI tract, such as inflammatory bowel disease (IBD). The hypothesis has been raised that intestinal colonization by potentially harmful bacteria may play a role in the pathogenesis of CD as well (47). CD patients have been shown to have an imbalanced intestinal microbiota compared to healthy individuals (48-50). While the role of the intestinal microbiota in CD pathogenesis remains to be determined, preventive approaches based on the administration of specific probiotic strains that regulate immune function and permeability (51) should be considered (39, 52).

#### **4.5 The effects of gluten-free diet**

Once the diagnosis of CD is established, the current therapy dictates a strict, lifelong eviction of gluten and associated immunogenic proteins from related grains (Figure 1-16). Avoidance of gluten maintains CD in remission. Such a diet is, however, difficult to follow and demanding for patients (53). Family education and support by a dietitian are necessary to avoid misunderstanding and frustration (54). Strict adherence to a GFD and its success depend on the severity of symptoms, psychosocial factors (55) and patients' knowledge of long-term benefits (56). Because of individual variability, it is difficult to determine and evaluate the exact gluten threshold that can be ingested safely by celiac patients. Nevertheless, a double-blind study has established that gluten intake should be kept under 50 mg/day (57) and, more recently, 10 mg/day was reported to be a safe limit (58).



In Europe, the CODEX alimentarius states that gluten content in gluten-free products should not exceed 20 ppm, while those that have been rendered gluten-free should contain less than 100 ppm. In contrast, in the USA, the Food and Drug Administration has proposed the “gluten-free” label only for food products containing less than 20 ppm.-Thus, labeling rules are different among countries, and this may contribute to increasing confusion and uncertainty among CD patients. Another setback relates to inadvertent dietary consumption. Non-adherence to a GFD is thus common because the use of gluten as an additive in processed foods is widespread (54). Finally, gluten-free products are generally more expensive than their gluten-containing counterparts, not widely available and not so diverse (59, 60). It is possible to substitute common pastry ingredients from wheat (starch/flour) in gluten-free baking using potato/corn starch, or potato/tapioca/rice flour (61, 62). However, gluten replacement is technologically challenging owing to its favorable effects on texture and palatability. Pseudo-cereals, (*i.e.* grains not belonging to the botanical *Poaceae* family), such as amaranth, quinoa and buckwheat, are interesting alternatives because of their good baking properties in the formulation of high-quality gluten-free products (63).

Although a GFD is assumed to be safe, it is not completely devoid of unwanted effects, especially if not under careful medical surveillance. Immune (64) and nutritional imbalance (65) has been associated with a GFD. A recent study has reported a reduction in beneficial gut bacteria populations in healthy subjects on GFD and this may have unknown pathophysiological consequences in the host (64) that require further investigation. Moreover, in order to compensate for decreased flavor and acceptability, gluten-free foods tend to have high fat and calorie content making patients prone to gain weight (54). Patients on a GFD frequently exhibit nutrient and fiber deficiencies (65-67). Thus, dietary enrichment or supplementation is commonly advocated to correct such deficits, and some fiber sources are recommended to avoid constipation (54). Additional labeling consensus, regarding nutritional values, is desirable to balance recommended daily intake (65). Uncontaminated oats are now considered safe for the vast majority of CD patients (68-71) (Figure 1-16). A long-term study has revealed that moderate ingestion of uncontaminated oats (50-70 g/day for adults) was well-tolerated according to histological and

immunological parameters. However some patients interrupted the trial due to the appearance of rash and flatulence (72).

The impact of a GFD on lifestyle cannot be ignored. As a consequence of such rigorous diet, patients are restricted in their common activities and suffer from social isolation (54, 56). This may in return lead to insufficient compliance to a GFD and persistence of CD symptoms. Gluten is a major component of human nutrition, and it would be more acceptable to CD patients if their daily diet could include minimal amounts of gluten. The following section discusses the recent progress achieved in the search for supportive therapies of CD (Tableau 1-7, Figure 1-18).

## 4.6 Can we “treat” celiac disease?

### 4.6.1 Celiac-safe wheat?

Wheat has been a traditional element of human nutrition, but evolutionary studies have revealed that certain celiac-toxic *Triticum* varieties were not cultivated at the beginnings of wheat domestication and agriculture. Today’s most common wheat breeds are hexaploid and arose in the Fertile Crescent 9000 years ago. During domestication, tetraploid (AA BB) *Turgidum* was hybridized with the diploid (DD) *Aegilops* variety. Such a step most likely introduced D genomes in current wheat species encoding for enhanced cold hardiness, but also for immunogenic  $\alpha$ -gliadin sequences (Figure 1-16). The consumption of these relatively modern wheat varieties are believed to have had an impact on the incidence of CD. Wheat *cultivars* with a lower amount of T-cell epitopes may be better tolerated by CD patients or help reduce the overall prevalence of the illness. A very recent approach with genetic deletion lines of Chinese Spring wheat has demonstrated the possibility of decreasing the T-cell stimulatory ability of wheat flour while retaining analogous dough properties (73).

The enzymatic treatment of flour is being tested to reduce gluten immunogenicity. A microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* has been found to decrease T-cell reactivity (74), after modifying toxic gliadin peptides with lysine or lysine methyl ester.

Also, bacterial fermentation can diminish gluten intolerance. *Lactobacilli*-fermented wheat flour mixed with celiac-safe flour (*i.e.* buckwheat) has led to well-tolerated bread with short-term safety (75). A similar approach has been proposed for the preparation of fermented durum wheat pasta containing 80% less gluten than its untreated counterparts (76). These examples demonstrate that the generation of wheat flour with less T-cell stimulatory epitopes that retain technological properties is potentially feasible (Figure 1-18). However, it remains questionable whether such measures can in fact ensure the long-term safety of wheat in CD patients.

#### 4.6.2 Exogenous enzymes can degrade gluten

The enzymatic approach is one of the most studied potential therapeutic strategies for CD (Figure 1-18, Tableau 1-17). Prolyl endopeptidases (PEPs) are proline-specific enzymes which, in contrast to human luminal enzymes, effectively cleave and therefore detoxify gluten peptides. Earlier studies investigated PEPs from *Flavobacterium meningosepticum* (FM-PEP), *Myxococcus xanthus* (MX-PEP) and *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP). FM- and MX-PEP favorably cleave longer peptides while SC-PEP is more specific for shorter sequences (77). These enzymes also are poorly stable at low pH (stomach) and in the presence of digestive enzymes (77, 78). Moreover, they are most active at pH 6-9 and presumably less functional in the gastric environment. To alleviate the pH-dependent decomposition of SC-PEP, variants of the enzyme have been developed by protein engineering and showed up to 20% enhanced activity with improved resistance to pepsin (79).

SC-PEP is currently being tested in a combinatory approach with EP-B2. The latter is a gastric-active, glutamine-specific endoprotease from germinated barley seeds. The proenzyme of EP-B2 is highly resistant to low pH and pepsin. Furthermore, it rapidly self-activates under acidic conditions (80). The combinatory approach with EP-B2/SC-PEP (ALV003, Alvine Pharma, San Carlos, CA) (81) is currently undergoing clinical phase IIa testing. ALV003-predigested gluten has been shown to significantly reduce gluten-related T-cell responses in CD patients compared to placebo-digested gluten (82). However, these findings were only observed with *in vitro* predigested gluten and GI symptoms typically induced by the gluten meal were not significantly reduced by ALV003-pretreatment (82).

Another enzyme, *Aspergillus niger* (AN-PEP, DSM Food Specialties, Delft, The Netherlands), has reached clinical testing as well. AN-PEP is reported to be resistant to low pH in the presence of pepsin and significantly degrades peptic-tryptic gluten digests under simulated gastric conditions (83). Recently, AN-PEP was tested in a clinical phase II and was well tolerated by CD patients. However, the enzyme treatment was not superior to placebo in preventing gluten-induced gastrointestinal deterioration as measured by serological, histological and life-quality changes (84).

While the enzymatic approach can effectively detoxify gluten peptides *in vitro* and seems to be well-tolerated by CD patients, its relative sensitivity to the harsh conditions encountered along the GI tract may require specialized delivery systems such as enteric coatings (85).

#### **4.6.3 Complexing gliadins in the gut**

Recently, it was proposed that polymeric binders could be implemented to sequester gliadins in the GI tract (86) (Figure 1-18, Tableau 1-7). The synthetic polymer poly(hydroxyethylmethacrylate-*co*-styrene sulfonate) (P(HEMA-*co*-SS)) complexes gliadin, forming supra-molecular particles at gastric and intestinal pHs (87, 88), and abrogates gliadin's deleterious effect on epithelial cells (86). This complexation is relatively selective towards gliadins *in vitro* (86). In addition, the sequestrant decreases gliadin digestion by GI enzymes, minimizing the formation of immunogenic peptides (86). The co-administration of P(HEMA-*co*-SS) attenuates gliadin-induced changes in permeability and inflammatory parameters in gluten-sensitive HLA-HCD4/DQ8 mice (86). Rodents treated with the polymer do not exhibit side effects, even after massive and prolonged dosing. As with other polymer-based therapies (89), systemic absorption of P(HEMA-*co*-SS) should be poor. This, in conjunction with its low-cost and possibility to be taken, occasionally, together with gluten-containing food, makes it an attractive option. Further investigation of the mechanisms of action of P(HEMA-*co*-SS) and its interaction with human tissues is required before its efficacy is investigated in human trials. A similar approach neutralizing gluten with anti-gluten antibodies from cow's milk has been also

proposed to treat CD (90). Since IgG can survive in the GI tract and can be extracted from milk, this could also represent an efficient and safe supportive strategy for CD.

#### 4.6.4 “Sealing” tight junctions

The intestinal epithelial uptake of gliadin has been extensively studied in the context of CD (91-93). Gliadin has been reported to increase intestinal permeability enabling non-specific paracellular diffusion of gliadin and its subsequent interaction with the mucosal immune system (91, 92). Gliadin peptides can also translocate transcellularly by interacting with the transferrin receptor CD71 on the apical side of immature enterocytes (93). This translocation further increases the availability of poorly digested gliadin to the mucosa, leading to antigen presentation of HLA-DQ2/DQ8-bound gliadin peptides to CD4<sup>+</sup> T-cells, and to the generation of effector cells (94) that cause autoimmune enteropathy. Thus, therapies based on the modulation of intestinal permeability aimed at reducing the uptake of immunogenic gliadin peptides into the lamina propria have been developed. The modulator of paracellular permeability, lazaretide acetate (AT-1001, Alba Therapeutics, Baltimore, MA), is a synthetic hexapeptide derived from *Zonula Occludens* toxin of *Vibrio Cholera* (95) (Figure 1-18, Tableau 1-7). In a pilot clinical trial that included CD patients, lazaretide acetate was well tolerated, and levels in plasma were below the limit of detection (< 0.5 ng/mL) after oral administration of 12 mg of drug. Acute symptoms were less frequent upon treatment. Intestinal barrier function, as measured by the lactulose/mannitol assay, was maintained despite a gluten challenge of 2.5 g. However, statistical significance between groups was not achieved regarding permeability, the differentiation of peripheral monocytes and IFN- $\gamma$  production (96). In a 6-week phase IIb trial, encouraging results were obtained in terms of symptoms and antibody titers (97). Unfortunately, the primary endpoint, which was set for permeability improvement and a decrease in the lactulose/mannitol ratio with escalating doses, was not reached. This may relate to the difficulty of measuring accurately intestinal permeability in a clinical setting. Overall the results show that lazaretide acetate remains a promising drug candidate, and raises the possibility that paracellular passage through tight junctions may not be the only mechanism target by this drug. Indeed, since gliadin may gain access to the mucosa through

transcellular pathways in addition to paracellular diffusion (93, 98), this strategy might be best exploited in combination with other treatments.

#### **4.6.5 Interfering with immune recognition**

In humans, transglutaminases belong to a family of 8 enzymes with diverse functions. They are part of several biological and pathological processes (99). tTG2 is one of the key enzymes in CD development (Figure 1-17), making it an attractive drug target. The two essential classes of tTG2 inhibitors are irreversible and reversible inhibitors (100). A number of irreversible inhibitors have been reported to form a stable covalent bond with this enzyme and prevent the deamidation of gliadin-related peptides (100, 101). Given the ubiquitous nature of tTG, reversible inhibitors would be more desirable in order to minimize possible side effects. Cinnamoyl triazole derivatives (102), aldehyde-bearing tTG modulators (103) and a modified peptide targeting the active cysteine site of tTG2 (26) can be cited in this class. The latter displays up to 225-fold specificity for tTG2 over other transglutaminase subtypes. Nevertheless, this approach will not abolish the innate response (104) or the immune response induced by non-deamidated peptides (105). Since all human transglutaminases share strong sequence identity and are important physiologically, specific inhibition of tTG2 remains critical in the design of a clinically-viable drug.

It is now well established that gliadin peptide presentation *via* the HLA system is fundamental in CD pathogenesis (Figure 1-17) (106). Thus, the development of DQ2/DQ8 inhibitors is another attractive strategy that is currently being explored. Peptidomimetic HLA-DQ2 blockers have been designed by sequence modification of the inflammatory 33-mer peptide as non-inflammatory derivatives. This approach has produced analogues retaining their strong affinity for DQ2, while not being recognized by fixed T-cells from CD patients. However, these blockers were effective only at high concentrations (107). Unlike other HLA proteins, DQ2 binding sites display a lysine residue whose positive charge plays a role in the higher affinity of HLA-DQ2 for negatively-charged deamidated gliadin peptides. Semi-synthetic peptides, bearing aldehyde groups that can reversibly react through Schiff's base formation with the active lysine site in the HLA-DQ2 binding pocket, have been tested and found to decrease T-cell stimulation compared to their native parent

(103). A recent study has described the design of peptides exhibiting 100- to 200-fold greater binding affinity for HLA-DQ2 than the best binding gluten peptide (108). For an optimal effect, these inhibitors would be ingested simultaneously or shortly before the gluten-containing food. Besides, the delivery of such molecules in CD is less challenging compared to other MHC-II-associated diseases (*e.g.* rheumatoid arthritis) (109), since they are aimed at acting directly in the intestine. The consequences of inhibiting DQ2 mediated antigen presentation on immune responses to pathogens need to be considered.

A naturally-occurring decapeptide in *Durum cultivar* has recently been reported to inhibit the immunotoxicity of gliadin peptides (110). Co-incubation of peripheral blood mononuclear cells with this peptide and gliadin peptides decreased cell proliferation and release of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (111). Its activity was explained by a shift of the pathogenic T-cell immune response from the immunostimulant Th1 to the Th2 phenotype (111). These results were obtained *ex vivo*, and only *in vivo* data will validate their relevance.

#### **4.6.6 Restoring immune tolerance toward gluten**

Impairment of immuno-regulatory mechanisms that control oral tolerance have been proposed as mechanisms that lead to autoimmune enteropathy in CD (112). An emerging strategy aiming at restoring immune tolerance of wheat peptides has been proposed after the systematic peptide mapping of T-cell reactive epitopes recognized by approximately 90% of CD patients. A clinical phase I study has been initiated with a vaccine containing mixture of immunotoxic peptides from  $\alpha$ - and  $\omega$ -gliadins and hordeins (113). This immunization compiles an assortment of CD-associated peptides, and its success will depend on the remaining intolerance of patients to less frequently recognized gluten epitopes. In addition, tolerance has been successfully induced by oral administration of engineered *Lactococcus lactis* secreting a DQ8-restricted gliadin peptide (114) or nasal application of recombinant  $\alpha$ -gliadin in a HLA-DQ8 transgenic mouse model (115).

Another original attempt to modulate the immune response to gluten consists of dermal inoculation of a “therapeutic helminth” (the human hookworm *Necator americanus*).

Epidemiological studies have revealed that the incidence of autoimmune inflammatory diseases has increased rapidly in the past 40 years. Today's hygiene standards and antihelminthic strategies have a strong stake in this progression (116, 117). Many findings in this field are still based on animal models, but "therapeutic" infections with helminth parasites could diminish overshooting autoimmune reactions. Pilot studies have been undertaken by successfully inoculating Crohn's disease patients with *Necator americanus* larvae (118). Very recently, a similar concept was completed in a phase II trial with CD patients (119). In this case, the hookworm infection is expected to reduce immune reactivity and gluten sensitivity.

#### **4.6.7 Other avenues**

In addition to hematopoietic stem cell transplantation (120), biological therapies aiming at hampering immune cell recruitment or modulating cytokine production are being evaluated for the treatment of several autoimmune diseases. Although, their side effects may be severe, they might be used as combination therapies, after a careful benefit/risk evaluation, in refractory CD treatment. Modulation of IL-15 and IL-10 has been suggested to influence the balance between tolerance and autoimmunity (121-126). Blocking IL-15 may contribute to the maintenance of epithelial integrity, limiting epithelial destruction and subsequently decreasing the passage of dietary antigens.

Given the role of adhesion molecules, such as integrins, during inflammatory processes, inhibiting leukocyte adhesion and preventing their migration may also prove useful in CD. Such potential therapies have been investigated in inflammatory bowel disease and include anti- $\alpha 4$ -integrin antibody (Natalizumab) (127), anti- $\alpha 4/\beta 7$ -integrin humanized antibody (MLN-02) (128) and  $\alpha 4$ -integrin antagonist (SB-683699) (129).

Finally, NKG2D receptors have been reported to be important in epithelial destruction (130-132). NKG2D antagonists have been proposed as a possible therapeutic target in CD (130). The potential usefulness of anti-NKG2D antibodies is supported by their success in rodent colitis (133). Another possibility currently being investigated in IBD relies on the stimulation of intestinal architectural regeneration by R-spondin, an intestinotrophic



mitogen (134). Even though the efficacy of such approaches has not been validated in CD, they may be worth considering in the future development of strategies for refractory CD and other complications.

Tableau 1-7. Pharmacological approaches to the treatment of Celiac disease

<b>Therapeutic option</b>	<b>Compound</b>	<b>Level of development</b>	<b>Reference</b>
<b>Oral enzyme supplementation</b>	ALV003	Phase II	(81)
	AN-PEP	Phase II	(136)
<b>Polymeric binders</b>	P(HEMA- <i>co</i> -SS)	Discovery	(86)
<b>Modulator of paracellular permeability</b>	AT-1001	Phase II	(97)
<b>Inhibitory analogues of gliadin T-cell epitopes</b>	Decapeptide (Durum wheat)	Discovery	(111)
<b>tTG2 inhibitor</b>	Several compounds	Discovery	(100-103, 107, 137)
<b>HLA-DQ2 blocker</b>	Several compounds	Discovery	(100-103, 107, 137)
<b>Human hookworm inoculation</b>	<i>Necator americanus</i>	Phase II	-
<b>Peptide vaccination</b>	Nexvax2	Phase I	(113)
<b>Other therapeutics</b>	Stimulator of intestine regeneration (R-spondin)	Discovery	(134)
	NKG2D/MICA blockers	Discovery	(132, 133)

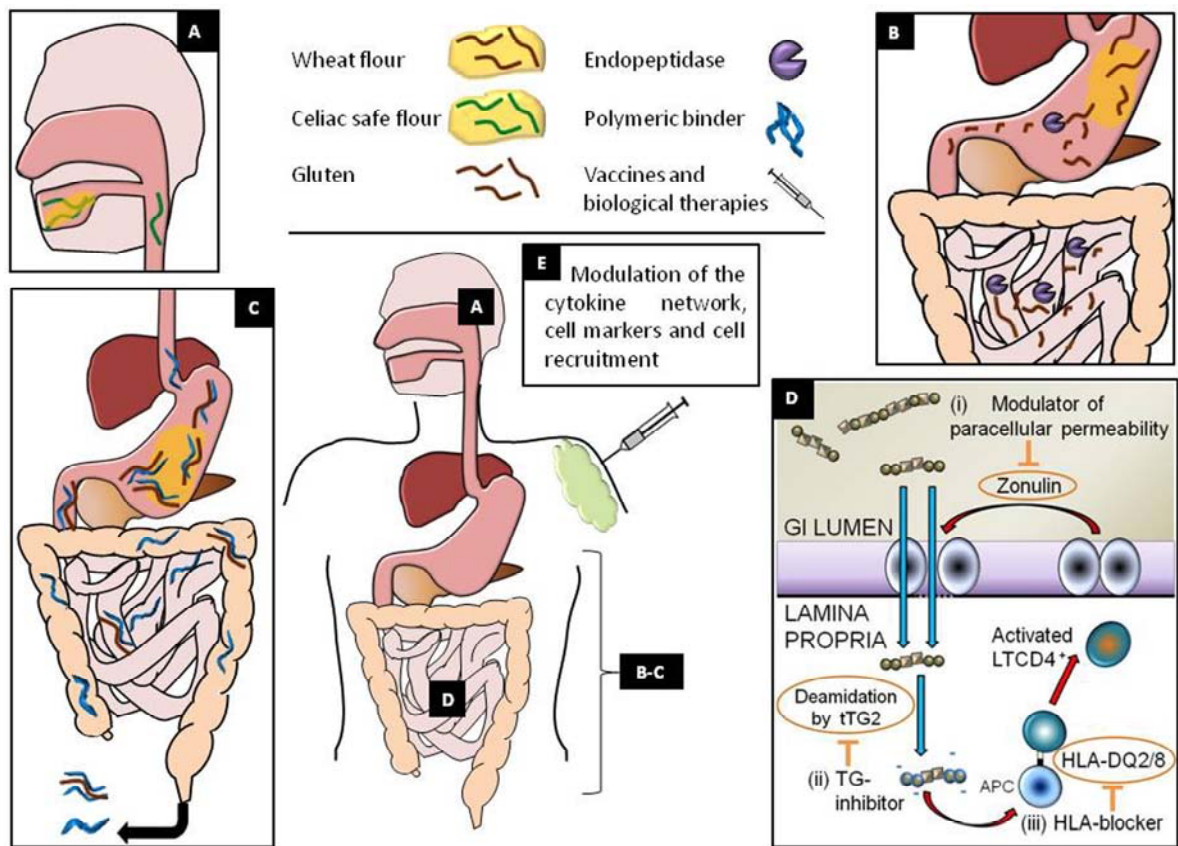


Figure 1- 18. Investigational treatments for celiac disease.

(A) Ingestion of celiac-safe flour. This flour can either be obtained by genetic modification of cereals (73), enzymatic treatment (74) or bacterial fermentation (75, 76). (B) Oral administration of exogenous enzymes to degrade proline- and glutamine-rich immunogenic peptides that trigger the disease (81, 83, 141). Depending on the enzyme, hydrolysis occurs in the stomach or in the upper small intestine. (C) Polymeric binders can sequester gliadins, forming complexes in the gastrointestinal lumen. These complexes hinder gliadin digestion, and diminishing the formation of immunogenic peptides (86). (D) Use of modulators of paracellular permeability to prevent the opening of tight junctions and restrict the passage of gluten peptides (i) (96, 97). Inhibition of tissue TG2 (ii) (102) or blockage of HLA molecules (iii) (103, 111, 137). (E) Modulation of immune responses by peptide vaccination (113), helminth inoculation (118), or interference with inflammatory cell recruitment (128).

## 4.7 Conclusion

CD displays a complex clinical and pathological spectrum and is one of today's most prevalent chronic gastrointestinal disorders. Many aspects of CD pathophysiology have been unraveled, making the implementation of therapeutic and prevention strategies a feasible goal. To assess the efficacy of prevention methods and impact on overall lifetime risk, long-term epidemiological studies will be needed. Regarding pharmacological therapies, a strict GFD should, and probably will remain the method of choice as it is an effective and safe strategy. Successful, supportive pharmacological therapy of CD should be correlated with disease severity. It should be affordable, almost completely devoid of side-effects, efficient and easy to administer. For non-refractory cases, in our opinion, the oral route is the most appropriate approach. For treatments that are not intraluminal, bioavailability will be an important issue, especially with peptide-based approaches.

These therapies should be accompanied by strict medical surveillance and should not encourage indiscriminate gluten consumption. This is an exciting new era in the therapeutic approach of CD and a variety of promising strategies are being developed. This will be a boon for CD patients by possibly allowing occasional consumption of small amounts of gluten (135). Furthermore, it can be hypothesized that avenues such as re-induction of tolerance will allow much greater freedom in food consumption. It can be foreseen that, for ethical reasons, these treatments will find their place as measures supportive of a GFD. The development of therapies which allow occasional exposure to low levels of gluten in adults with CD is expected to decrease the burden of disease and improve patients' quality of life.

## 4.8 Conflict of interest

**Guarantor of the article:** M. Pinier, G. Fuhrmann, E. Verdu and J-C Leroux.

**Specific author contribution:** Primary authors: M. Pinier and G. Fuhrmann; co-authors: E. Verdu and J-C Leroux.

**Financial support:** Financial support from the Canadian Celiac Association and CAG/CIHR (E. Verdu), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les

Technologies (FQRNT), the Canadian Celiac Association and IG Zöliakie der Deutschen Schweiz is acknowledged.

**Potential competing interest:** None to declare.

## 4.9 References

1. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;29:647-55.
2. Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. The spectrum of celiac disease: Epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;(4):204-13.
3. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology* 2009;137:88-93.
4. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:1217-25.
5. Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child* 2006;91:39-43.
6. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* 2005;293:2343-51.
7. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2333-40.
8. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med* 2006;3:e358.
9. Ludvigsson JF, Montgomery SM, Ekbom A, Brandt L, Granath F. Small-intestinal histopathology and mortality risk in celiac disease. *JAMA* 2009;302:1171-8.
10. van der Windt D, Jellema P, Mulder CJ, Kneepkens CMF, van der Horst HE. Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA* 2010;303:1738-46.
11. Molberg O, Solheim Flaete N, Jensen T, et al. Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:337-44.
12. Rubio-Tapia A, Kelly DG, Lahr BD, Dogan A, Wu TT, Murray JA. Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. *Gastroenterology* 2009;136:99-107.
13. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007;357:1731-43.
14. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003;362:383-91.
15. Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray J. Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systemic approach. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2016-21.
16. Leffler DA, Dennis M, Hyett B, Kelly E, Schuppan D, Kelly CP. Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:445-50.

17. Catassi C, Bearzi I, Holmes G. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology* 2005;128suppl.1:S79-S86.
18. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 2008;40:395-402.
19. Saukkonen T, Ilonen J, Akerblom HK, Savilahti E. Prevalence of coeliac disease in siblings of patients with type I diabetes is related to the prevalence of DQB1\*02 allele. *Diabetologia* 2001;44:1051-53.
20. Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N, et al. Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1\*02-DQA1\*05 and TNF-308A. *Diabetes care* 2006;29:858-63.
21. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *New Engl J Med* 2008;359:267-77.
22. Biagi F, Corazza G. Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:158-62.
23. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:590:2275-9.
24. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
25. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12:4175-9.
26. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 2009;137:1912-33.
27. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* 2009;373:1480-93.
28. Sollid LM, Khosla C. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;23:140-7.
29. Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Quarantino S, Maiuri L. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol* 2005;42:913-8.
30. Peters U, Schneeweiss S, Trautwein EA, Erbersdobler HF. A case-control study of the effect of infant feeding on celiac disease. *Ann Nutr Metab* 2001;45:135-42.
31. Labbok MH, Clark D, Goldman AS. Breastfeeding: maintaining an irreplaceable immunological resource. *Nat Rev Immunol* 2004;4:565-72.
32. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-7.
33. Verdu EF, Bercik P, Bergonzelli GE, et al. *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2004;127:826-37.
34. Pietzak M. Bacterial colonization of the neonatal gut. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38:389-91.
35. D'Arienzo R, Maurano F, Lavermicocca P, Ricca E, Rossi M. Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine* 2009;48:254-9.
36. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, Persson LA. Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002;75:914-21.

37. Carlsson A, Agardh D, Borulf S, Grodzinsky E, Axelsson I, Ivarsson SA. Prevalence of celiac disease: before and after a national change in feeding recommendations. *Scand J Gastroenterol* 2006;415:553-8.
38. Agostoni C, Decsi T, Fewtrell M, et al. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;461:99-110.
39. Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab* 2009;101:68-78.
40. Elli L, Bergamini CM, Bardella MT, Schuppan D. Transglutaminases in inflammation and fibrosis of the gastrointestinal tract and the liver. *Dig Liv Dis* 2009;41:541-50.
41. Ferrara F, Quaglia S, Caputo I, et al. Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2009;159:217-23.
42. Ivarsson A, Hernell O, Nystrom L, Persson LA. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Health* 2003;571:36-9.
43. Ruggeri C, La Masa AT, Rudi S, et al. Celiac disease and non-organ-specific autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci* 2008;538:2151-5.
44. Verdu EF, Mauro M, Bourgeois J, Armstrong D. Clinical onset of celiac disease after an episode of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Can J Gastroenterol* 2007;217:453-5.
45. Mastropasqua E, Rolandi R, Farruggio A, Lirussi F. *Giardia duodenalis*: a confounding factor for the diagnosis of celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2003;362:185-6.
46. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Davidson EJ. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. *Dig Dis Sci* 2002;47:2625-34.
47. De Palma G, Capilla A, Nadal I, et al. Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine. *Curr Iss Mol Biol* 2010;12:1-10.
48. Nadal I, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol* 2007;56Pt 12:1669-74.
49. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009;623:264-9.
50. Collado MC, Calabuig M, Sanz Y. Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Iss Intestin Microbiol* 2007;81:9-14.
51. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, et al. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol* 2008;1523:552-8.
52. Verdu EF. Probiotics effects on gastrointestinal function: beyond the gut? *Neurogastroenterol Motil* 2009;215:477-80.
53. Whitaker JKH, West J, Holmes GKT, Logan RFA. Patient perceptions of the burden of coeliac disease and its treatment in the UK. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;2910:1131-6.
54. Niewinski MM. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc* 2008;1084:661-72.

55. Edwards George JB, Leffler DA, Dennis M, Franko DL, Blom-Hoffman J, Kelly CP. Psychological correlates of gluten-free diet adherence in adults with celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 2009;43:301-6.
56. Olsson C, Hornell A, Ivarsson A, Sydner YM. The everyday life of adolescent coeliacs: issues of importance for compliance with the gluten-free diet. *J Hum Nutr Diet* 2008;21:359-67.
57. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007;85:160-6.
58. Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:1044-52.
59. Stevens L, Rashid M. Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Can J Diet Pract Res* 2008;69:147-50.
60. Lee AR, Ng DL, Zivin J, Green PH. Economic burden of a gluten-free diet. *J Hum Nutr Diet* 2007;20:423-30.
61. Jackson V, Schilling MW, Falkenberg SM, Schmidt TB, Coggins PC, Martin JM. Quality characteristics and storage stability of baked and fried chicken nuggets formulated with wheat and rice flour. *J Food Qual* 2009;32:760-74.
62. Sabanis D, Lebesi D, Tzia C. Development of fibre-enriched gluten-free bread: a response surface methodology study. *Int J Food Sci Nutr* 2009;60:174-90.
63. Alvarez-Jubete L, Auty M, Arendt EK, Gallagher E. Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *Eur Food Res Technol* 2010;230:437-45.
64. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr* 2009;102:1154-60.
65. Kirby M, Danner E. Nutritional deficiencies in children on restricted diets. *Pediatr Clin N Am* 2009;56:1085-103.
66. Kinsey L, Burden ST, Bannerman E. A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:1333-42.
67. Thompson T, Dennis M, Higgins LM, Lee AR, Sharrett MK. Gluten-free diet survey: are Americans with coeliac disease consuming recommended amount of fibre, iron, calcium and grain foods? *J Hum Nutr Diet* 2005;18:163-9.
68. Garsed K, Scott BB. Can oats be taken in a gluten-free diet? A systematic review. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:171-8.
69. Troncone R, Auricchio R, Granata V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:329-33.
70. Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kempainen TA, et al. A comparison of diets with and without oats in adults with celiac-disease. *N Engl J Med* 1995;333:1033-7.
71. Pulido OM, Gillespie Z, Zarkadas M, et al. Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease: a systematic review. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, 2009.
72. Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, et al. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002;50:332-5.

73. Van den Broeck HC, Van Herpen TW, Schuit C, et al. Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biol* 2009;9:41.
74. Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, et al. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology* 2007;133:780-9.
75. Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, et al. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1088-96.
76. Di Cagno R, de Angelis M, Alfonsi G, et al. Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *J Agric Food Chem* 2005;53:4393-402.
77. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, et al. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 2005;129:786-96.
78. Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J* 2004;383Pt 2:311-8.
79. Ehren J, Govindarajan S, Moron B, Minshull J, Khosla C. Protein engineering of improved prolyl endopeptidases for celiac sprue therapy. *Protein Eng Des Sel* 2008;21:699-707.
80. Bethune MT, Strop P, Tang Y, Sollid LM, Khosla C. Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem Biol* 2006;13:637-47.
81. Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology* 2007;132:472-80.
82. Tye-Din JA, Anderson RP, Ffrench RA, et al. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin Immunol* 2010;134:289-95.
83. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, et al. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2006;291:G.621-9.
84. Tack GJ, Van de water J, Kooy-Winkelaar EM et al. Can prolyl endoprotease enzyme treatment mitigate the toxic effect of gluten in coeliac patients? *Gastroenterology* 2010 ; 138: S – 54 .
85. Gass J, Ehren J, Strohmeier G, Isaacs I, Khosla C. Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy. *Biotechnol Bioeng* 2005;92:674-84.
86. Pinier M, Verdu EF, Nasser-Eddine M, et al. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2009;136:288-98.
87. Liang L, Pinier M, Leroux JC, Subirade M. Interaction of alpha-gliadin with poly(HEMA-co-SS): structural characterization and biological implication. *Biopolymers* 2009;91:169-78.



88. Liang L, Pinier M, Leroux JC, Subirade M. Interaction of alpha-gliadin with polyanions: design considerations for sequestrants used in supportive treatment of celiac disease. *Biopolymers* 2010;93:418-28.
89. Plone MA, Petersen JS, Rosenbaum DP, Burke SK. Sevelamer, a phosphate-binding polymer, is a non-absorbed compound. *Clin Pharmacokinet* 2002;417:517-23.
90. Fox BS. Antibody therapy for treatment of diseases associated with gluten intolerance. Patent WO 2007/056301, 2007.
91. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *Am J Pathol* 2008;1735:1243-52.
92. Lammers KM, Lu R, Brownley J, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 2008;1351:194-204 e3.
93. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* 2008;2051:143-54.
94. Molberg O, McAdam S, Lundin KE, et al. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* 2001;315:1317-23.
95. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 2006;414:408-19.
96. Paterson BM, Lammers KM, Arrieta MC, Fasano A, Meddings JB. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;265:757-66.
97. Kelly CP, Green PH, Murray JA, et al. Safety, tolerability and effects on intestinal permeability of larazotide acetate in celiac disease: results of a phase IIB 6-week gluten-challenge clinical trial. *Gastroenterology* 2009;1365, Supplement 1:A-474.
98. Schumann M, Richter JF, Wedell I, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* 2008;576:747-54.
99. Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* 2002;3682:377-96.
100. Siegel M, Khosla C. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol Ther* 2007;1152:232-45.
101. Watts RE, Siegel M, Khosla C. Structure-activity relationship analysis of the selective inhibition of transglutaminase 2 by dihydroisoxazoles. *J Med Chem* 2006;4925:7493-501.
102. Pardin C, Roy I, Lubell WD, Keillor JW. Reversible and competitive cinnamoyl triazole inhibitors of tissue transglutaminase. *Chem Biol Drug Des* 2008;723:189-96.
103. Siegel M, Xia J, Khosla C. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. *Bioorg Med Chem* 2007;1518:6253-61.
104. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;3629377:30-7.

105. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 2000;1914:603-12.
106. Qiao SW, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol* 2009;211:111-7.
107. Xia J, Siegel M, Bergseng E, Sollid LM, Khosla C. Inhibition of HLA-DQ2-mediated antigen presentation by analogues of a high affinity 33-residue peptide from alpha2-gliadin. *J Am Chem Soc* 2006;1286:1859-67.
108. Kapoerchan VV, Wiesner M, Hillaert U, et al. Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Mol Immunol* 2010;475:1091-7.
109. Falcioni F, Ito K, Vidovic D, et al. Peptidomimetic compounds that inhibit antigen presentation by autoimmune disease-associated class II major histocompatibility molecules. *Nat Biotechnol* 1999;176:562-7.
110. De Vincenzi M, Gasbarrini G, Silano V. A small peptide from durum wheat gliadin prevents cell agglutination induced by prolamins-peptides toxic in coeliac disease. *Toxicology* 1997;1203:207-13.
111. Silano M, Di Benedetto R, Maialetti F, et al. A 10-residue peptide from durum wheat promotes a shift from a Th1-type response toward a Th2-type response in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2008;872:415-23.
112. Cerf-Bensussan N. Autoimmunity and diet. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*; 2009: S Karger Pub; 2009. p. 91-9.
113. Keech CL, Dromey J, Tye-Din JA, Anderson RP. Immune tolerance induced by peptide immunotherapy in an HLA Dq2-dependent mouse model of gluten immunity *Gastroenterology* 2009;1365:A-57.
114. Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, et al. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Ab<sup>o</sup> Dq8 transgenic mice. *J Immunol* 2009;1834:2390-6.
115. Senger S, Luongo D, Maurano F, et al. Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. *Immunol Lett* 2003;882:127-34.
116. Weinstock JV, Elliott DE. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* 2009;151:128-33.
117. Weinstock JV, Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Jr., Thompson R. The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. *J Lab Clin Med* 2002;1396:334-8.
118. Croese J, O'Neil J, Masson J, et al. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut* 2006;551:136-7.
119. Daveson AMJ, Jones D, McSorley H, et al. A phase 2A randomized double blinded placebo controlled study evaluating immunity and gluten sensitivity by inoculating coeliac disease patients with the human hookworm *necator americanus*. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24Suppl.2:A221.
120. Al-toma A, Visser OJ, van Roessel HM, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory celiac disease with aberrant T cells. *Blood* 2007;1095:2243-9.

121. Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsoe B, et al. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005;529:2686-92.
122. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;1253:730-45.
123. Malamut G, Afchain P, Verkarre V, et al. Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology* 2009;1361:81-90.
124. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 2006;554:469-77.
125. Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, et al. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* 2005;541:46-53.
126. Menassa R, Du C, Yin ZQ, et al. Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid tobacco expressing human interleukin-10 in a mouse model of colitis. *Plant Biotechnol J* 2007;51:50-9.
127. Targan SR, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Natalizumab for the treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE trial. *Gastroenterology* 2007;1325:1672-83.
128. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the (alpha)4(beta)7 integrin. *N Engl J Med* 2005;35224:2499-507.
129. Davenport RJ, Munday JR. Alpha4-integrin antagonism an effective approach for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today* 2007;1213-14:569-76.
130. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;213:367-77.
131. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;213:357-66.
132. Tang F, Chen Z, Ciszewski C, et al. Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med* 2009;2063:707-19.
133. Kjellev S, Haase C, Lundsgaard D, Urso B, Tornehave D, Markholst H. Inhibition of NKG2D receptor function by antibody therapy attenuates transfer-induced colitis in SCID mice. *Eur J Immunol* 2007;375:1397-406.
134. Zhao J, de Vera J, Narushima S, et al. R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2007;1324:1331-43.
135. Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol* 2009;1046:1587-94.
136. Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, et al. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;37:687-94.
137. Ozaki S, Ebisui E, Hamada K, et al. Potent transglutaminase inhibitors, aryl [beta]-aminoethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;203:1141-4.

138. Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, et al. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 2003;1254:1105-13.
139. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007;1171:41-9.
140. Molberg O, Uhlen AK, Jensen T, et al. Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. *Gastroenterology* 2005;1282:393-401.
141. Ehren J, Moron B, Martin E, Bethune MT, Gray GM, Khosla C. A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLos One* 2009;47:e6313.

## 5 Objectifs

L'objectif principal de cette thèse était de tester un nouveau traitement d'appoint de la maladie cœliaque (lors de voyages, ou d'évènements particuliers). Plus particulièrement, il s'agissait de mettre au point et d'évaluer un polymère séquestrant de la gliadine.

Pour ce faire, nous avons établi les objectifs spécifiques suivants :

- \* Synthétiser et caractériser une petite bibliothèque de copolymères P(HEMA-*co*-SS) afin d'obtenir une structure (masse molaire et ratio de monomères) optimale pour la complexation de la gliadine.
- \* Vérifier la spécificité de la complexation comparativement à d'autres protéines retrouvées dans le bol alimentaire.
- \* Tester la toxicité des candidats sur divers types de cellules.
- \* S'assurer que le polymère prévenait les effets délétères de la gliadine *in vitro* sur différents types cellulaires.
- \* Étudier l'effet du polymère sur la digestion enzymatique de gliadine, de gluten de blé et d'hordéine d'orge *in vitro*.
- \* Tester l'efficacité du copolymère *in vivo* vis-à-vis de la gliadine et du gluten.
- \* Évaluer la toxicité du polymère *in vivo* ainsi que la pharmacocinétique/biodistribution.
- \* Évaluer l'efficacité du polymère *ex vivo* sur des cellules extraites de biopsies de patients (sains et malades).

Ces divers objectifs sont étudiés dans les 2 manuscrits ci-après.

## **Chapitre 2 Polymeric Binders Suppress Gliadin-Induced Toxicity in the Intestinal Epithelium**

Maud Pinier<sup>1</sup>, Elena F. Verdu<sup>4</sup>, Mohamad Nasser-Eddine<sup>1</sup>,  
Chella S. David<sup>3</sup>, Anne Vézina<sup>2</sup>, Nathalie Rivard<sup>2</sup> and Jean-Christophe Leroux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, QC, Canada.

<sup>2</sup>CIHR Team in Digestive Epithelium, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, QC, Canada.

<sup>3</sup>Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, NY, USA.

<sup>4</sup>Intestinal Disease Research Programme, Faculty of Health Sciences, McMaster University, Hamilton, ON, Canada

Financial support from the Canadian Celiac Association, Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, Canadian Institutes of Health Research (N.R.), National Institutes of Health DK 071003 (CD), CAG/CIHR New Investigator Establishment Award (EFV) and the Canada Research Chair program.

Published in *Gastroenterology*, 2009, 136(1):288-98

## 1 Abbreviations

APC: antigen presenting cells

ATRP: atom transfer radical polymerization

BSA: bovine serum albumin

CD: celiac disease

CFA: complete Freund's adjuvant

DMEN: Dulbecco's modified eagle medium

EP: endoprotease

FBS: fetal bovine serum

HEMA: hydroxyethylmethacrylate

HLA: human leukocyte antigen

HRP: horseradish peroxidase

IEL: intraepithelial lymphocyte

Ip: intraperitoneal

Isc: short circuit current

MHC: major histocompatibility complex

P(HEMA-*co*-SS) : poly(hydroxyethylmethacrylate-*co*- styrene sulfonate)

PCDE: primary cultures of human differentiated enterocytes

PEG: poly(ethylene glycol)

PEP: prolylendopeptidase

PSS: polystyrene sulfonate

SS: styrene sulfonate

ZO-1: zonula occludens-1

## 2 Abstract

**Methods:** Gliadin was neutralized by complexation to a linear copolymer of hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and sodium 4-styrene sulfonate (SS). The ability of the polymeric binder to abrogate the damaging effect of gliadin on cell-cell contact was investigated in IEC-6, Caco-2/15 and primary cultured differentiated enterocytes. The efficacy of the polymeric binder in preventing gliadin-induced intestinal barrier dysfunction was assessed using gliadin-sensitive HLA-HCD4/DQ8 transgenic mice.

**Results:** P(HEMA-*co*-SS) complexed with gliadin in a relatively specific fashion. Intestinal cells exposed to gliadin underwent profound alterations in morphology and cell-cell contacts. These changes were averted by complexing the gliadin with P(HEMA-*co*-SS). More importantly, the P(HEMA-*co*-SS) hindered the digestion of gliadin by gastrointestinal enzymes, thus minimizing the formation of immunogenic peptides. Co-administration of P(HEMA-*co*-SS) with gliadin to HLA-HCD4/DQ8 mice attenuated gliadin-induced changes in the intestinal barrier and reduced intraepithelial lymphocyte and macrophage cell counts.

**Conclusion:** Polymeric binders can prevent *in vitro* gliadin-induced epithelial toxicity and intestinal barrier dysfunction in HCD4/DQ8 mice. They have a potential role in the treatment of patients with gluten-induced disorders.

**Keywords:** polymeric binders, celiac disease, gluten intolerance



### 3 Introduction

Celiac disease (CD) is an immune enteropathy triggered by the ingestion of gluten-containing grains (wheat, barley, rye) in susceptible individuals. Screening studies have demonstrated that CD is one of the most frequent genetically based diseases, occurring in 1 out of 200-300 people worldwide<sup>1</sup> and up to 1% of Caucasians<sup>2</sup>. Moreover, milder forms of gluten intolerance have been recognized as a possible contributor to irritable bowel syndrome even in the absence of full-blown CD<sup>3</sup>. The development of the disease is closely associated to genes that code for human leukocyte antigens (HLA) DQ2 and DQ8, molecules of the major histocompatibility complex (MHC)<sup>4</sup>, and to other non-HLA genes. Recently, specific peptide fragments of  $\alpha$ -gliadin (a gluten prolamine) were identified as possible triggers for the response to gluten in CD patients. Three of the most immunogenic epitopes are contained in a 33 amino acid peptide (57-89)<sup>5</sup> that is exceptionally resistant to enzymatic processing due to its high content in proline and glutamine. These 3 epitopes induce T-cell-proliferation *via* the interaction antigen presenting cells (APC) and HLA-DQ2/DQ8<sup>4</sup>. The toxicity of these motifs was found to be even greater after deamination of specific glutamine residues by tissue transglutaminases 2<sup>4,5</sup>. On the other hand, the non immunodominant 31-43 peptide<sup>6</sup>, triggers an innate response *via* IL-15<sup>7</sup>. To date, no pharmacological treatment is available to gluten-intolerant patients. This can lead to poorly controlled disease patients as poor adherence to a gluten-free diet, whether voluntary or inadvertently, is common<sup>8</sup>. Various therapeutic avenues are currently being explored to tackle this pathology. These include administration of (i) bacterial endopeptidases<sup>4</sup>, or probiotics<sup>9</sup> that can completely digest the toxic gluten-derived peptides, (ii) inhibitors of the zonulin pathway<sup>10</sup>, (iii) inhibitors of tissue transglutaminases<sup>11</sup>, (iv) peptides that block the binding of immunogenic gliadin fragments to DQ2 and DQ8<sup>12</sup>, (v) recombinant IL-10 to suppress gliadin-dependent T-cell activation<sup>13</sup> and (vi) antibodies neutralizing IL-15<sup>14</sup> or IFN- $\gamma$ <sup>8</sup>. Other non medical approaches consist in generating gluten-free dietary products<sup>15</sup>, using fermentation as a means to degrading gluten and its derivatives contained in cereals<sup>16</sup> or chemically modifying gliadin to block the T-cell response<sup>17</sup>.

In this work, a yet unexplored strategy based on synthetic polymeric binders that complex and neutralize gliadin *in situ* was investigated. Polymeric binders are high molecular weight polymers that are used to reduce the intestinal absorption of endogenous or exogenous molecules. They act in the gastrointestinal tract without being absorbed into the bloodstream, thereby minimizing the potential toxicity and adverse effects<sup>18</sup>

## 4 Materials and Methods

### 4.1 Materials

$\alpha$ -Gliadin (from whole wheat var. Triticum vulgare) was supplied by Prof. Popineau (Institut National de la Recherche Agronomique, Nantes, France). Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Serological Proteins (Kankakee, IL). Poly(hydroxyethylmethacrylate-co-styrene sodium sulfonate) (P(HEMA-co-SS) (45:55  $\pm$  2 mol%, 40 kDa) was synthesized as described in the supplementary material section. Peptide 31-43 mer (LGQQQPFPPQQPY) was purchased from Sigma-Genosis (The Woodlands, TX). Zonula Occludens-1 (ZO-1) rabbit antibodies were provided by ZYMED<sup>®</sup> laboratories (San Francisco, CA). Secondary anti-rabbit FITC-labelled antibodies were provided by Chemicon International (Mississauga, ON, Canada). Matrisperse Cell Recovery solution<sup>®</sup> was purchased from BD Bioscience (Mississauga, ON, Canada). The Caco-2/15 cell line was a gift from Dr. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY), while IEC-6 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) penicillin 10,000 U/mL, streptomycin 10,000  $\mu$ g/mL, trypsin/EDTA and HEPES were from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). All other materials were obtained from Sigma-Aldrich.

### 4.2 Methods

#### 4.2.1 Polymer-gliadin complexation

Binding studies were carried out at pH 1.2 and 6.8. P(HEMA-co-SS) (80-800 mg/mL) and different proteins (40-400 mg/mL) were mixed together at pH 1.2 (50 mM

KCl and 85 mM HCl) or 6.8 (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 mM NaOH) and incubated for 2 h at 37°C. The dispersions were then centrifuged at 16,000 g for 30 min to separate the insoluble complexes from the free proteins. The supernatants were then analysed by SDS-PAGE and proteins were visualized by Coomassie blue staining. Quantification of the bands was performed using a densitometer and protein binding was expressed relative to a polymer-free control.

#### 4.2.2 Digestion

$\alpha$ -Gliadin alone or complexed with P(HEMA-*co*-SS) at pH 1.2, was subjected to sequential digestion with pepsin (3370 U/mg) (pH 2, 2 h, 37°C) and a mixture of chymotrypsin (76 U/mg, from bovine pancreas) and trypsin (11600 U/mg) (pH 6.8, 2 h, 37°C). The enzymes were subsequently heat-inactivated for 30 min. The samples were centrifuged at 5000 g for 30 min, the supernatants recovered, filtered through a GHP 0.2- $\mu$ m membrane (low binding, Millex Inc, Cork, Ireland) and freeze-dried and stored until analysis. The freeze-dried gliadin digests were re-suspended in water and analyzed by HPLC as described in the supplementary material section.

#### 4.2.3 Cell culture

Caco-2/15 cells were cultured as reported elsewhere<sup>19</sup>. The routine subculture was carried out every 4 days upon reaching 80% confluence. IEC-6 cells were grown on plates in DMEM supplemented with 5% FBS, 4 mM glutamine, 50 U/mL penicillin and 50  $\mu$ g/mL streptomycin. The routine subculture was carried out at confluence. Primary cultures of human differentiated enterocytes (PCDE) were prepared from fetal human small intestines ranging from 16 to 20 weeks of age using a non enzymatic procedure (Matrisperse Cell Recovery solution<sup>®</sup>) and cultured as described by Perreault and Beaulieu<sup>20</sup>. The protocol was approved by the Institutional Human Research Review Committee of University of Sherbrooke for the use of human material. All cells were cultured in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The binders used in all cell assays were PSS (50 kDa) and P(HEMA-*co*-SS) dispersed in culture medium.

#### 4.2.4 Immunofluorescence microscopy

IEC-6 cells were seeded and grown on Lab-Tek chamber slides<sup>®</sup> (Nalgen Nunc International, Rochester, NY) for 2 days prior the experiments. For F-actin staining, cells were incubated for 30 min in various media, washed twice with phosphate buffered saline (PBS), fixed in paraformaldehyde 3% for 15 min at room temperature and permeabilized with 0.1% Triton-X 100 for 10 min. Thereafter, cells were blocked in PBS containing 2% BSA for 20 min at room temperature after which they were incubated for 30 min with phalloidin-FITC and washed 3 times with PBS. Caco-2/15 cells were grown for 8 days after reaching confluence and then processed as previously described<sup>21</sup> to obtain longitudinal sections that were immunostained for ZO-1.

#### 4.2.5 Cell viability assay

Viability of PCDE treated or not with whole gliadin in the presence or absence of P(HEMA-*co*-SS) was monitored by the trypan blue exclusion test<sup>22</sup>.

#### 4.2.6 *In vivo* efficacy experiments

All experiments were approved by the McMaster or Montreal University Animal Care Committees, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines.

Transgenic male mice (~26 g), 6 to 8 weeks old and expressing HLA-HCD4/DQ8 (HLA-DQA1\*0301; HLA-DQB1\*0302) genes in the absence of endogenous mouse class II genes were used<sup>23</sup>. The animals were sensitized to gliadin as previously described<sup>24</sup>. Briefly, mice were injected intraperitoneally (ip) with 500 µg of gliadin dissolved in 0.02 M acetic acid plus 50 µL of complete Freund's adjuvant (CFA). Non-sensitized mice (controls) received CFA ip only. Starting one week later, gliadin challenge was performed 3 times a week by intragastric gavage, for 3 weeks, using 2 mg of whole gliadin dissolved in 0.02 M acetic acid. Four groups of mice were used: 1) non-sensitized mice, 2) non-sensitized mice gavaged with P(HEMA-*co*-SS) (6 mg in water), 3) gliadin-sensitized mice gavaged with gliadin (2 mg), 4) gliadin-sensitized mice gavaged with gliadin (2 mg) and P(HEMA-*co*-SS) (6 mg). P(HEMA-*co*-SS) was administered 5 min prior to the gliadin gavage. Mice were sacrificed 24 h after the last gavage and cross sections from proximal small intestine

were preserved in 10% formalin, then processed and stained with hematoxinilin and eosin. Specimens were examined under light microscopy for epithelial damage.

**Intestinal permeability** - Two sections of the jejunum and the ileum from each mouse were used for epithelial ion and macromolecule transport measurements<sup>24</sup>. Briefly, 5 cm sections of tissues were removed and divided into two segments. Each segment was opened along the mesenteric border, rinsed and mounted in an Ussing chamber (exposed surface area 0.6 cm<sup>2</sup>). Tissues were bathed in oxygenated Krebs buffer containing 10 mM glucose (serosal side) or 10 nM mannitol (luminal side) at 37°C. The net active transport across the epithelium was measured *via* a short circuit current (Isc) injected through the tissue under voltage clamp conditions. After a 15-min equilibration period, baseline Isc and conductance were recorded. Horseradish peroxidase (HRP) was used as a model protein to probe macromolecular permeability. HRP was added (10<sup>-5</sup> M) to the luminal buffer once equilibrium was reached. Serosal samples (500 µL) were taken at 30-min intervals for 2 h and replaced with fresh buffer to maintain constant volume. The enzymatic activity of HRP was measured using a modified Worthington method as previously described<sup>25</sup>.

**Immunohistochemistry** - Immunostaining for CD3<sup>+</sup> cells was performed on paraffin sections as described elsewhere<sup>24</sup>. A mean value was obtained and expressed as the number of positive cells per five villi. Intraepithelial lymphocytes (IELs)/20 enterocytes in five randomly chosen villous tips were counted according to the method of Biagi *et al.*<sup>26</sup>, and expressed as IEL/100 enterocytes. Immunostaining for macrophages was performed on paraffin sections as described previously<sup>24</sup>. Positive cells for F4/80 staining were counted in the lamina propria in five villi randomly chosen using two different sections per mouse. A mean value was obtained and expressed as the number of macrophage-positive cells per five villi.

#### 4.2.7 *In vivo* toxicity experiments

Wild type male Balb/c mice (~18 g) 4 to 6 weeks old were used to assess the safety of P(HEMA-*co*-SS). Mice (n= 7/group) were given P(HEMA-*co*-SS) or poly(ethylene glycol) (PEG, 35 kDa) dissolved in the drinking water (3 mg/mL). Control mice received water only. Mice were weighed daily for 22 days and the daily drinking water consumption

was estimated (~5 mL/day). The mice were then euthanized and the jejunum, stomach and liver were harvested and analyzed histologically for signs of toxicity. Hematoxinilin and eosin stained slides of the organs were examined under optical microscopy. Blood samples were analyzed for biochemical and cellular parameters by the Quebec Transgenic Research Network.

#### 4.2.8 Statistical analysis

Mean and median of each group were compared and homoscedasticity was verified using F test to ensure the normal distribution. Then, group values were compared using a parametric ANOVA test, followed by Tukey's test to determine the significance of all paired combinations.

## 5 Results

### 5.1 P(HEMA-*co*-SS) binds gliadin

$\alpha$ -Gliadin is a poorly water soluble protein with an isoelectric point of ~6. Therefore, it is positively charged as occurs in the stomach, at a pH of 1.2, and almost neutral and highly hydrophobic at the intestinal pH (5.5-7). In order to maximize affinity for gliadin at both low and high pH values, SS, a monomer capable of forming both electrostatic and hydrophobic interactions with the protein through its sulfonated aromatic ring was incorporated in the chelating polymer. SS units were copolymerized with HEMA. The latter hydrophilic monomer was introduced to favour hydrogen bonding, but mainly to ensure the biocompatibility of the binder. As shown in Figure 2-1a, the copolymer succesfully complexed with gliadin at pH 6.8. At that pH, the charge of  $\alpha$ -gliadin is approximatively neutral, the interactions with the copolymer are either hydrophobic in nature or due to hydrogen bonds<sup>27</sup>. The influence of polymer composition on complex formation was investigated by SDS-PAGE at gastric and intestinal pHs. Under acidic conditions, P(HEMA-*co*-SS) exhibited a strong binding to gliadin (>75%), irrespective of the SS content. Conversely, at pH 6.8, the affinity of gliadin for the polymer strongly depended on the SS content. The binding increased with the SS amount and levelled off at

about 55 mol% (supplementary Fig. 2-1). The specificity of the polymer-gliadin interaction was examined at pH 6.8 in the presence of several other proteins commonly found in food such as BSA, ovalbumin and lysozyme. A cocktail of these different proteins was incubated with P(HEMA-*co*-SS) in the presence of gliadin and analyzed by SDS-PAGE. As can be seen from Figure 2-1b and 2-1c, the copolymer interacted preferentially with the highly hydrophobic  $\alpha$ -gliadin, compared to most other hydrophilic food proteins/peptides. Indeed, the observed binding efficiency was  $\sim 4$ -times for gliadin compared to albumin at the same protein concentration.

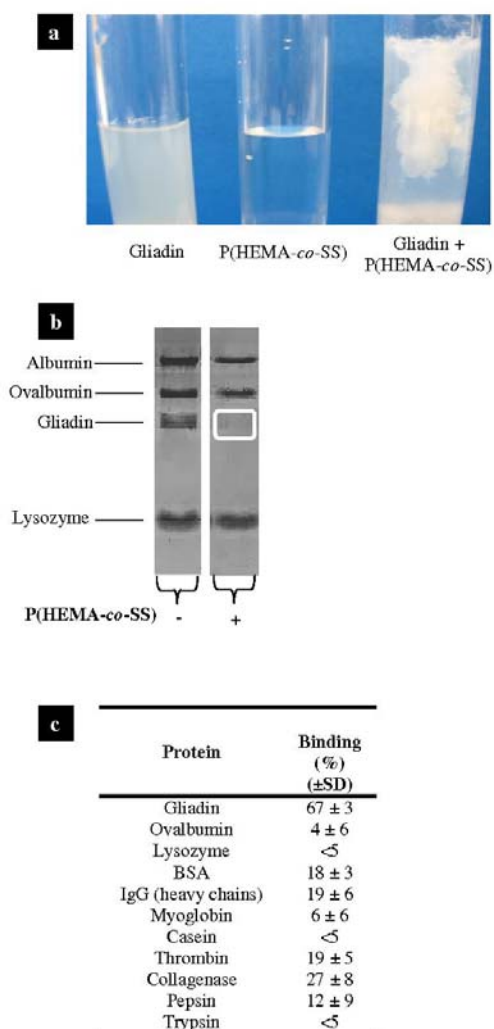


Figure 2-1. (a) Illustration of the complexation of the polymeric binder with gliadin; (b) SDS-PAGE of albumin, ovalbumin,  $\alpha$ -gliadin and lysozyme (40 mg/mL) incubated with

(+) or without (-) P(HEMA-co-SS) (25 kDa) (protein/polymer weight ratio of 1:2) at pH 6.8 and 37°C.  $\alpha$ -Gliadin bands do not appear as dark as the other protein bands because Coomassie blue staining is less intense with this protein. (c) Selectivity of P(HEMA-co-SS) toward gliadin over various proteins using SDS-PAGE. Values are means  $\pm$  SD, n=4 experiments.

## **5.2 P(HEMA-co-SS) does not perturb IEC-6 cytoskeleton and morphology**

The effect of various polymers on the integrity of the cytoskeleton of IEC-6 intestinal epithelial cells was first monitored by staining the F-actin with phalloidin-FITC (Fig. 2-2). Two binders, namely P(HEMA-co-SS) and the SS homopolymer (PSS), were compared to PEG, a well-known innocuous polymer PEG. Cells incubated with either PEG (panel i, arrow) or P(HEMA-co-SS) (panel ii, arrow), did not experience any changes in morphology, and the staining of F-actin revealed intact cell-cell contacts. Moreover, neither polymer affected cell viability. In contrast, PSS induced a rapid loss of cell-cell contacts as shown in panel iii (arrow). *In-vitro*, PSS was shown to possess a greater affinity for phospholipid membranes compared to P(HEMA-co-SS) (data not shown). Thus, PSS may influence cellular membrane functioning or cell signalling processing leading to cell damages. Therefore, further investigations were pursued only with P(HEMA-co-SS).



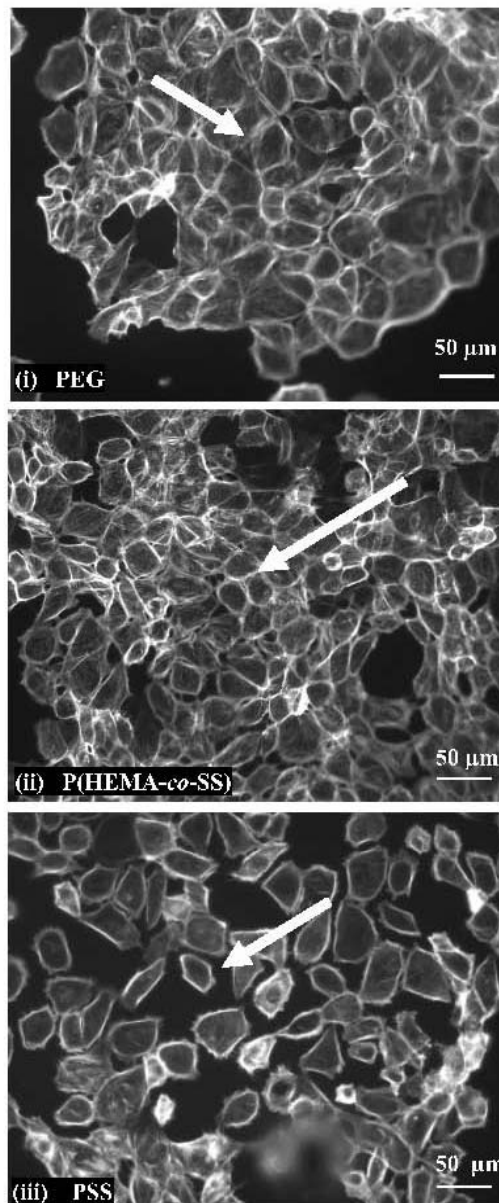


Figure 2-2. Effect of chelating polymer on intestinal epithelial cell cytoskeleton and morphology. IEC-6 cells were incubated for 30 min with 1 mg/mL of PEG (negative control) (i), P(HEMA-*co*-SS) (ii) and PSS (iii). White arrows indicate F-actin at cell-cell contacts in panels i and ii, and disruption of cell-cell contact in panel iii.

### 5.3 P(HEMA-*co*-SS) abolishes the deleterious effect of gliadin on the cell cytoskeleton and junctional protein (ZO-1)

Next, it was investigated whether P(HEMA-*co*-SS) could prevent the direct effects of gliadin on intestinal epithelial cells. Gliadin has been reported to induce cytoskeleton reorganization and ultrastructural damages in cultured intestinal epithelial cells<sup>28</sup>. The incubation of IEC-6 cells with gliadin decreased the number of intracellular actin filaments (Fig. 2-3a). In addition, the cells treated with gliadin were loosely connected and irregularly shaped (Fig. 2-3a, panel ii, arrow). Comparatively, no significant changes were observed when cells were exposed to BSA at a similar concentration (Fig. 2-3a, panel i, arrow). The effect of gliadin on the actin cytoskeleton was partially or completely prevented by the co-addition of P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:1 (Fig. 2-3a, panel iii, arrow) or 1:2 (panel iv, arrow), respectively.

To analyze the impact of gliadin on tight junctions, the human colon cancer cell line Caco-2/15 was used. It provides a unique and well characterized model for the study of intestinal epithelial differentiation<sup>19</sup>. On longitudinal sections, immunostaining of differentiated Caco-2/15 cells (8 days post-confluence) confirmed that the immunoreactivity of ZO-1 was restricted to the apex of the lateral cell membrane (Fig. 3b, panel i, arrows). When these cells were treated with gliadin, ZO-1 immunolocalization in the apex was partially or completely lost (Fig. 3b, panel ii, arrows), as recently reported<sup>29</sup>. However, ZO-1 immunoreactivity was progressively restored upon the co-addition of increasing amounts of P(HEMA-*co*-SS) (Fig. 2-3b, panels iii and iv, arrows).

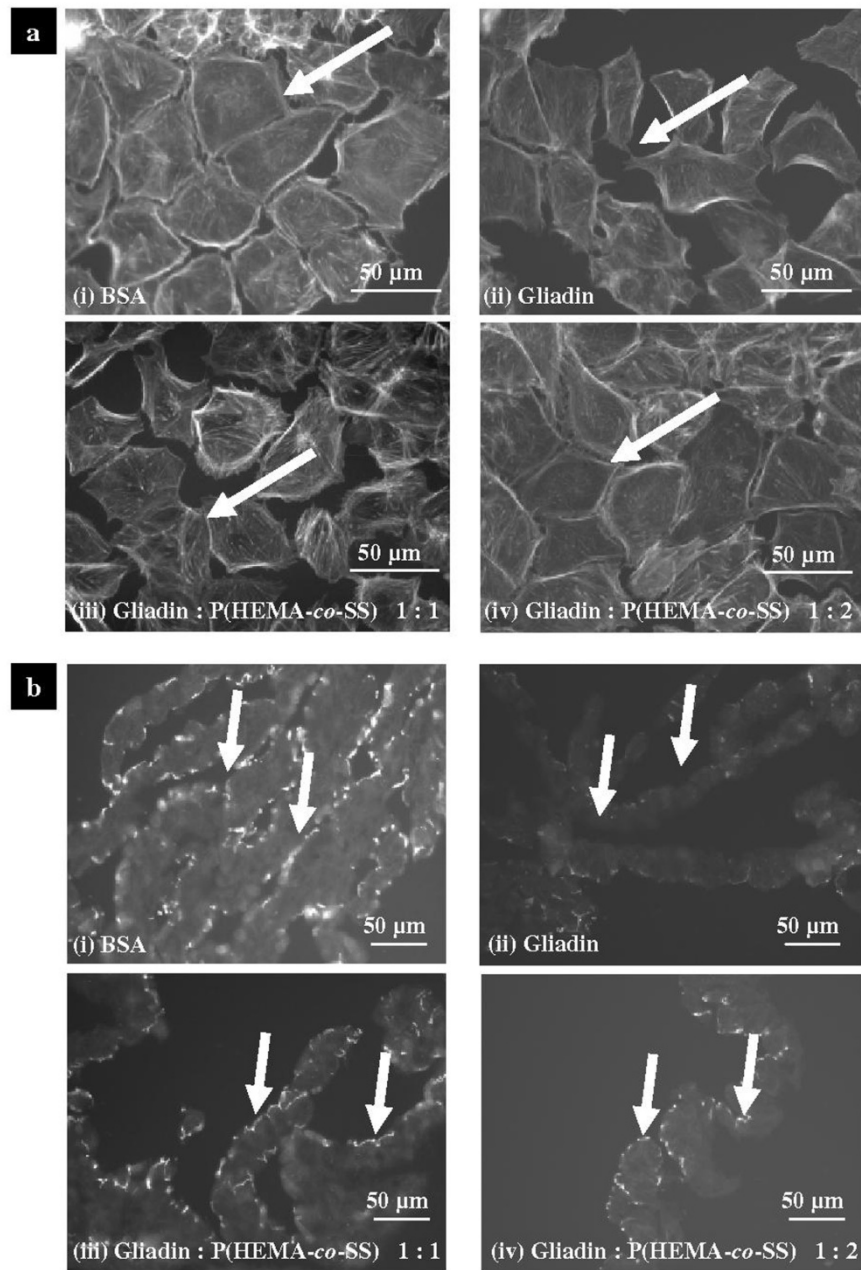


Figure 2-3. Effect of gliadin complexation with P(HEMA-co-SS) on intestinal epithelial cell cytoskeleton **(a)** and junctional protein ZO-1 **(b)**. **a)** IEC-6 cells were incubated for 30 min with 0.5 mg/mL of BSA **(i)**, gliadin alone **(ii)** or in combination with P(HEMA-co-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:1 **(iii)** and 1:2 **(iv)**. White arrows indicate cell-cell contacts in panels i, iii and iv, and a disruption of cell-cell contacts in panel ii. Data shown are representative of three different experiments. **b)** Caco-2/15 cells were incubated for 30

min with 0.5 mg/mL BSA (**i**), gliadin alone (**ii**) or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:1 (**iii**) and 1:2 (**iv**). Arrows in panels i, iii and iv point the ZO-1 protein. Arrows in panel ii indicate the lost of ZO-1 staining.

#### **5.4 P(HEMA-*co*-SS) abolishes the cytotoxic effect of gliadin on PCDE**

The cytotoxicity of gliadin, alone or complexed with P(HEMA-*co*-SS) was evaluated on PCDE<sup>20</sup>. After 48 h incubation with gliadin, disruptions occurred in the cell lawn, as evidenced by the presence of empty areas (supplementary Fig. 2-2). The addition of P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:2 was able to revert this effect back to that of normal cells (*i.e.* treated with BSA). Cell mortality was quantified using the trypan blue assay. As illustrated in Figure 2-4, treatment of PCDE with gliadin during 48 h significantly increased cell mortality in comparison to BSA. The sensitivity of this cell model to gliadin can be explained by the absence of mesenchyme or by the Matrisperse<sup>®</sup> treatment. Importantly, the cytotoxic effect of gliadin was abolished by P(HEMA-*co*-SS). Moreover, incubation with P(HEMA-*co*-SS) did not alter the viability of PCDE even after 48 h.

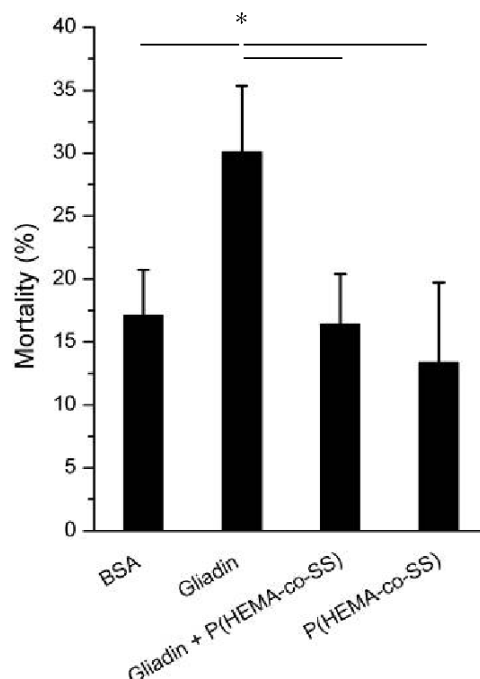


Figure 2-4. P(HEMA-*co*-SS) abolishes the cytotoxic effect of gliadin on primary cultures of human intestinal epithelial cells. PCDE were incubated for 48 h with 0.5 mg/mL BSA, gliadin alone or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:2, and P(HEMA-*co*-SS) alone. Mortality was quantified by the trypan blue assay. \* $p \leq 0.02$ .

### 5.5 P(HEMA-*co*-SS) hinders the enzymatic hydrolysis of gliadin

The ability of the polymeric binder to protect  $\alpha$ -gliadin from enzymatic digestion was assessed by HPLC analysis. When gliadin was incubated in presence of P(HEMA-*co*-SS), no native protein and less degradation products were detected (supplementary Fig. 2-3). For example, compared to the uncomplexed gliadin (Fig. 2-5), the area under the peak at the elution time of 9.5 min decreased by 50 and 80%, min in the presence of P(HEMA-*co*-SS) at 1:1 (ii) and 1:2 (iii) gliadin/polymer weight ratios. The data suggest a decrease in the formation of the immuno-modulatory peptide as this peptide elutes at 9.5 min.

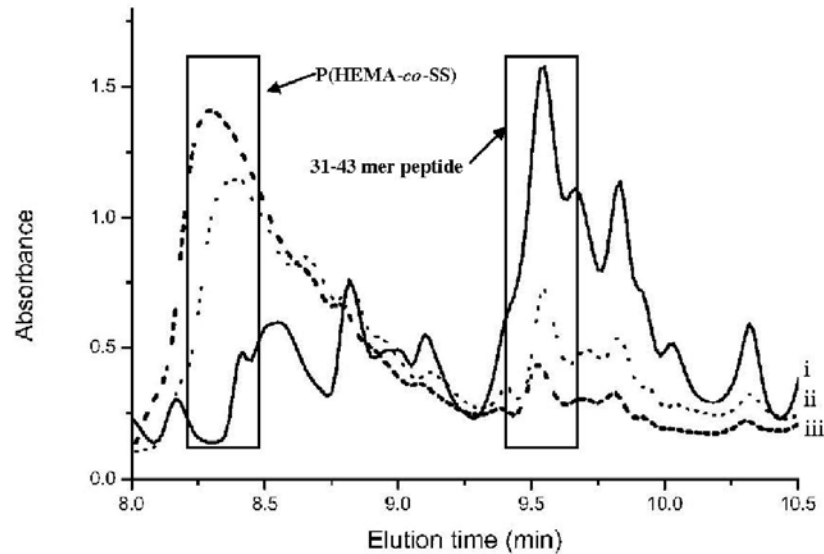


Figure 2-5. HPLC traces of  $\alpha$ -gliadin after enzymatic degradation with pepsin, trypsin and chymotrypsin in the absence (i) or presence of P(HEMA-co-SS) at a gliadin/polymer weight ratio 1:1 (ii) and 1:2 (iii).

## 5.6 P(HEMA-co-SS) abolishes the gliadin-induced effects on barrier function in HCD4/DQ8-mice

To test whether P(HEMA-co-SS) could reverse intestinal barrier abnormalities induced by gliadin *in vivo*, gluten sensitive HLA-DQ8/HCD4 transgenic mice were employed<sup>24,30</sup>. As shown before<sup>24</sup>, gliadin-sensitized HLA-DQ8/HCD4 mice gavaged with gliadin demonstrated significant increases in baseline ion transport (Isc) (Fig. 2-6a) and increased HRP flux (Fig. 2-6b) compared to non-sensitized controls. The hypersecretory state and increased macromolecular transport observed in gluten-sensitive mice were normalized in animals treated with P(HEMA-co-SS) administered orally 5 min prior to gliadin. Additionally, administration of P(HEMA-co-SS) alone to mice, did not alter barrier function. Finally, intestinal permeability measurements in the ileum was similar between the negative control animals and those receiving P(HEMA-co-SS) prior to gliadin gavage

(supplementary Fig. 2-4). The data suggest that the deleterious effects of gliadin did not occur farther down in the gastro-intestinal tract in the presence of the binder.

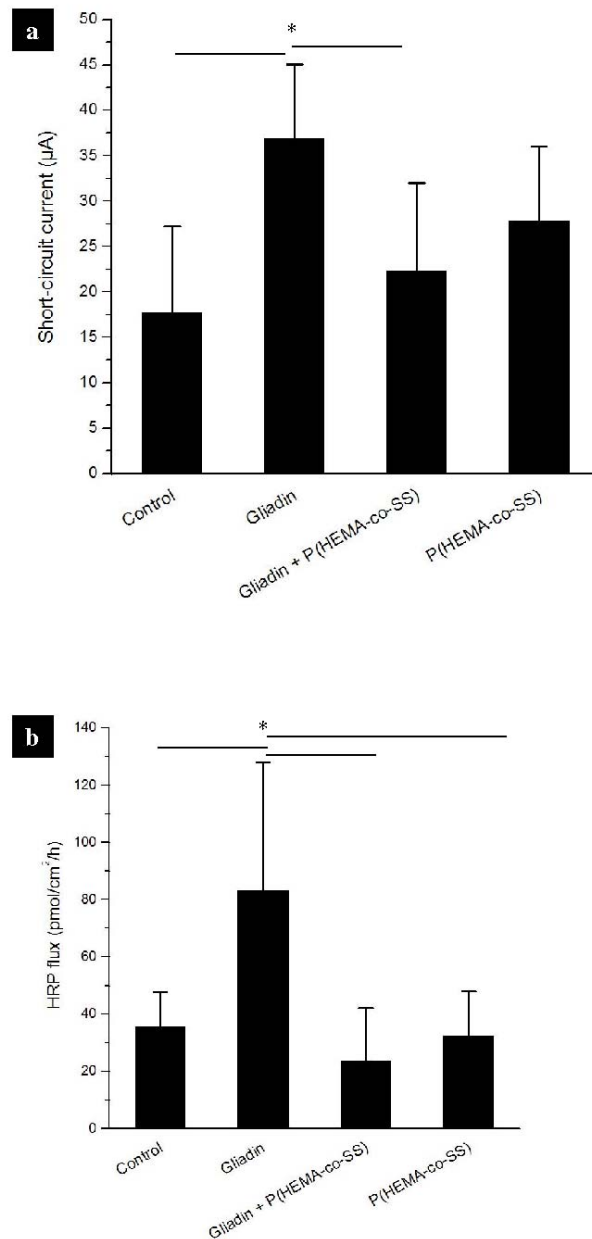


Figure 2-6. P(HEMA-co-SS) abolishes the gliadin-induced barrier dysfunction in HCD4/DQ8 mice. Controls consisted of non-sensitized mice gavaged with or without P(HEMA-co-SS). Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin with or without polymer (n=6-7/group). Administration of P(HEMA-co-SS)

significantly decreased baseline ion transport (**a**) and HRP flux (**b**) compared to untreated gliadin-sensitized mice. \* $p \leq 0.02$ .

### **5.7 Increased CD3<sup>+</sup> and F4/80 counts in gliadin-sensitive HCD4/DQ8 mice are attenuated by P(HEMA-*co*-SS)**

The analysis of H&E stained slides under optical microscopy did not reveal villous atrophy in any group (supplementary Fig. 2-5). Nevertheless, gliadin induced increased CD3<sup>+</sup> and F4/80 cell counts in sensitized HCD4/DQ8 mice, as expected<sup>24</sup>. Interestingly, treatment with the polymeric binder abrogated the cellular response to gliadin, bringing the CD3<sup>+</sup>IEL and macrophage counts back to the control levels. Mice exposed to P(HEMA-*co*-SS) alone had CD3<sup>+</sup>IEL (Fig. 2-7a) and F4/80<sup>+</sup> cell counts (Fig. 2-7b) comparable to the non-sensitized controls. During this experiment, mice were monitored on a weekly basis for signs of toxicity. No clinical adverse effects were detected and no weight loss recorded in any of the groups (supplementary Fig. 2-6).



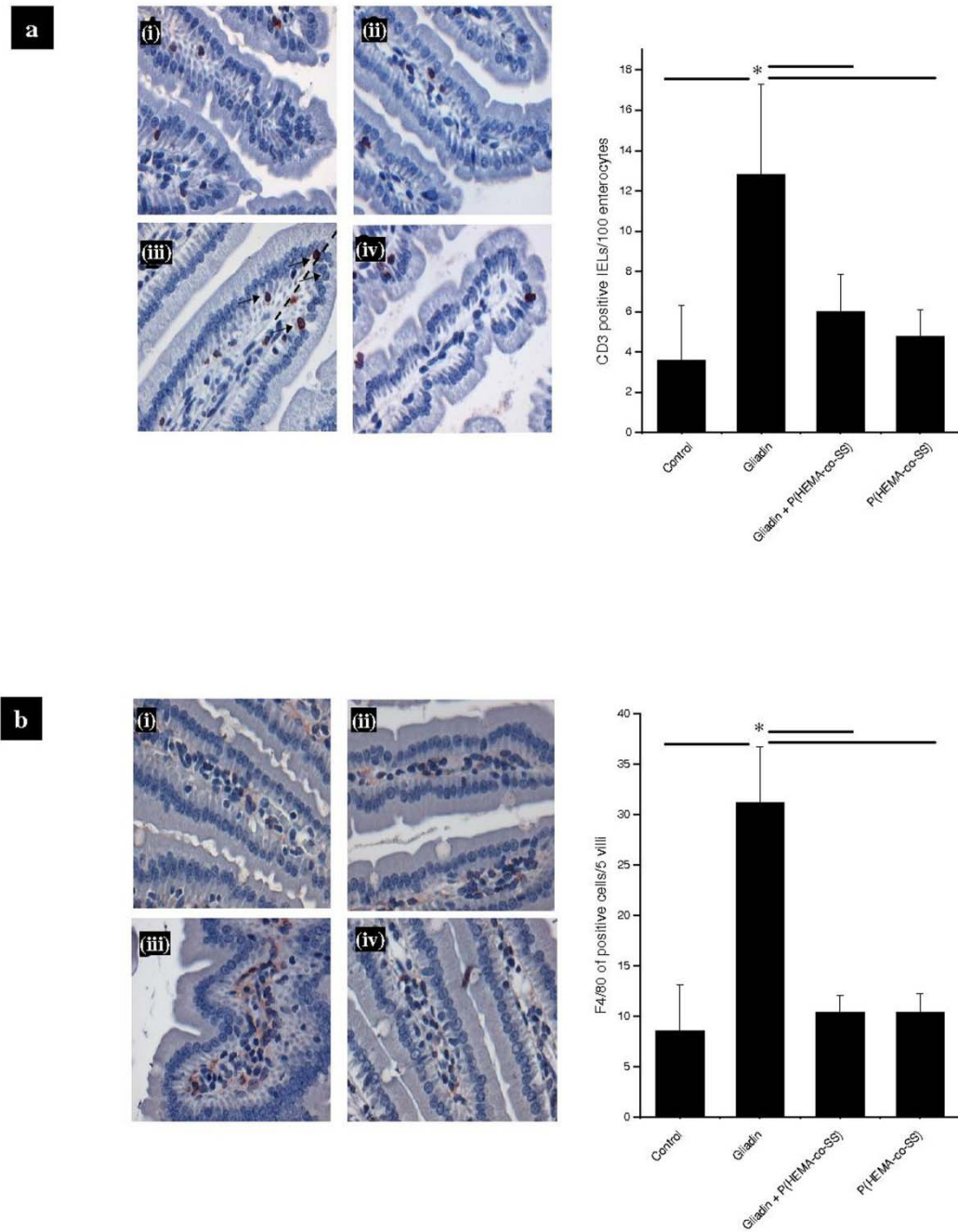


Figure 2-7. P(HEMA-*co*-SS) significantly decreased CD3<sup>+</sup> (a) and F4/80<sup>+</sup> cells (b) compared to untreated gliadin-sensitized mice. Immunohistochemistry and histogram show the number of CD3<sup>+</sup>-IEL and elongated F4/80<sup>+</sup> cells in the lamina propria: (i) non-sensitized mouse gavaged with rice, (ii) non-sensitized mouse challenged with P(HEMA-*co*-SS), (iii) gliadin-sensitized mouse challenged with gliadin (iv) gliadin-sensitized mouse challenged with gliadin and P(HEMA-*co*-SS). \* $p \leq 0.05$ .

## 5.8 P(HEMA-*co*-SS) is safe *in vivo* when administered at high doses

In order to further assess the safety of P(HEMA-*co*-SS), the polymer was administered to healthy Balb/c mice at a high dose of 15 mg/day (830 mg/kg/day) for 22 days. Control groups consisted of mice receiving water or PEG. Mice were monitored 6 times a week for signs of distress, such as hunching, immobility, lack of grooming and weight loss. No clinical ill effect was recorded in either group. At the end of the experiment, all 3 groups exhibited a similar weight gain (Fig. 2-8a). Moreover, there was no difference between their biochemical and cellular clinical parameters (supplementary Table 1). However the histological analysis of the jejunum (Fig. 2-8b), liver and stomach did not reveal any abnormalities (data not shown).

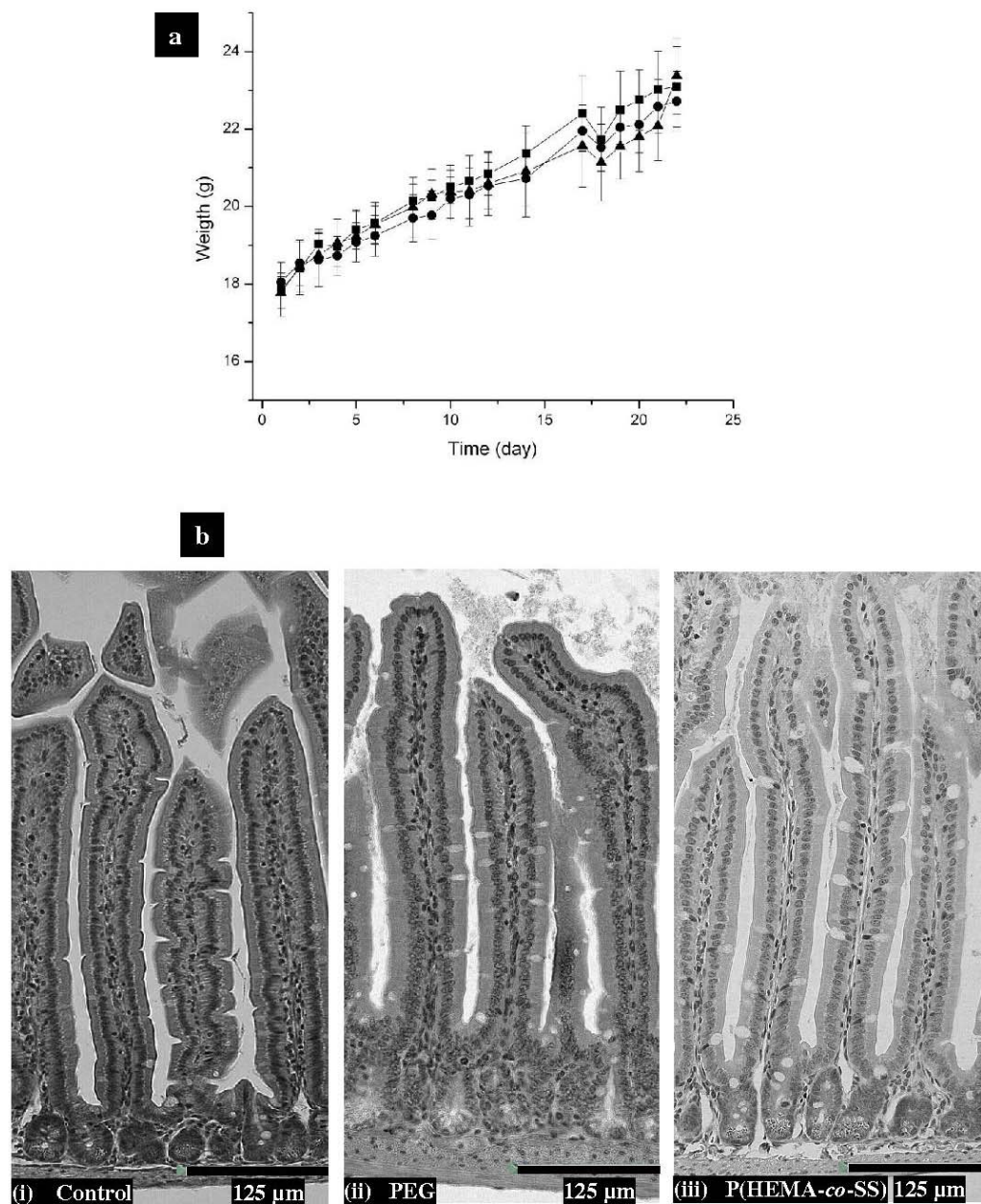


Figure 2-8. **(a)** Weights of mice fed with water (circle), PEG (triangle) and P(HEMA-*co*-SS) (square), at an average polymer dose of 15 mg/day. Administration of P(HEMA-*co*-SS) did not change significantly the weight gain after 22 days (mean  $\pm$  SD). **(b)** Hematoxylin and eosin stained sections of jejunum in mice which received water **(i)**, PEG **(ii)** and P(HEMA-*co*-SS) **(iii)**.

## 6 Discussion

In this manuscript, we report for the first time a sequestering polymer that may prove useful in the clinical management of gluten intolerance and CD, conditions for which there are no pharmacological treatments.

Polymeric binders are commonly used in clinical situations to sequester small endogenous molecules such as potassium, bile salts and phosphates<sup>18</sup>. When given orally, polymeric sequestrants are not absorbed, and are usually well tolerated even upon chronic ingestion of large doses (up to 6-15 g/day)<sup>31</sup>. Recently, a SS polymer was reported to neutralize the *Clostridium difficile toxin A*, a common cause of severe nosocomial diarrhea.

Our results show that a copolymer of SS and HEMA can selectively complex gliadin and abolish the direct toxic effects of the protein on rat and human intestinal epithelial cells (IEC-6, Caco-2/15, PCDE). The protective effect of P(HEMA-*co*-SS) on the cell-cell contacts and integrity of ZO-1, a membrane-associated protein involved in tight junctions, is especially meaningful. Gliadin and its immunomodulatory fragments have indeed been shown to induce a MyD88-dependent zonulin release that causes opening of tight junctions in subjects with dysregulation of the zonulin system<sup>32</sup>. This was found to enable the paracellular translocation of gliadin and its digested fragments, and their subsequent interaction with macrophages within the intestinal submucosae. By sequestering gliadin, P(HEMA-*co*-SS) may prevent such events to occur.

The most dramatic property of the P(HEMA-*co*-SS) was its ability to slow down the enzymatic digestion of gliadin. In particular, P(HEMA-*co*-SS) brought about an 80% reduction of immunogenic peptide 31-43 containing peak that is involved in the innate response due to IL-15<sup>7</sup>. It has recently been suggested that the intestinal barrier could be the initial target of gliadin peptides, initiating a cascade of events that, in a genetically predisposed host, leads to gluten-induced pathology<sup>33</sup>. The effectiveness of P(HEMA-*co*-SS) was further tested in a murine model of gluten sensitivity<sup>24</sup>. Its ability to block the gliadin-induced alteration of intestinal barrier parameters and the increase in CD3<sup>+</sup>IEL and F4/80<sup>+</sup> lamina propria cell counts, suggest that efficient gliadin sequestration can occur *in vivo*.

To date, a few experimental therapies have been tested with variable results. One of the simplest experimental therapeutic strategies consists in using probiotics<sup>9</sup> and/or exogenous enzymes to cleave the immunomodulatory peptides and reduce their luminal concentration. For example, prolylendopeptidase<sup>34</sup> and endoprotease EP-B2<sup>35</sup>, used alone or in combination<sup>36</sup> were shown to alleviate gluten toxicity under simulated intestinal conditions. On wild type animals<sup>35</sup>, the EP-B2/gluten diet significantly decreased the formation of the 33-mer peptide. A preliminary clinical study using PEP was performed by Gray, Khosla and coworkers<sup>37</sup>. The fact that some patients responded to a PEP digest that had apparently lost its immunogenicity when tested *in vitro* on gliadin-specific T cell lines remains puzzling. A second clinical assay based on oral enzyme therapy has recently been published by Cornell *et al.*<sup>38</sup>. Histological improvement was not major in the few tested patients and the changes in anti-tissue transglutaminases antibodies were modest. Even if those results suggest some protection, they emphasize the need for complementary approaches.

The enzymatic and the chelating strategies share similarities such that they are not aimed at reinstating a normal diet but rather at improving the quality of life of poorly controlled CD patients by reducing the immunogenic peptide burden below a tolerated threshold<sup>39</sup>. To ensure a greater control over the disease, sequestering polymers may be used in conjunction with other investigated drugs such as inhibitors of tissue transglutaminases<sup>40</sup>, peptides blocking the binding of immunogenic gliadin fragments to DQ2 and DQ8 and inhibitors of the zonulin pathway<sup>10,33</sup>.

In conclusion, P(HEMA-*co*-SS) supplementation has the potential to become a safe adjuvant therapy for the control of gluten-induced disorders. Future work will be aimed at investigating the effect of the binder on the immune response triggered by gliadin on human biopsies from CD patients, as well as assessing its efficacy in the presence of gluten-containing cereals.

## 7 References

1. Mulder CJ, Cellier C. Coeliac disease: changing views. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:313-21.
2. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003;348:2517-24.
3. Wahnschaffe U, Schulzke JD, Zeitz M, et al. Predictors of clinical response to gluten-free diet in patients diagnosed with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:844-50.
4. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
5. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, et al. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 2000;6:337-42.
6. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;362:30-7.
7. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 2007;132:994-1008.
8. Sollid LM, Khosla C. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:140-7.
9. De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:80-93.
10. Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, et al. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci* 2000;113 4435-40.
11. Watts RE, Siegel M, Khosla C. Structure-activity relationship analysis of the selective inhibition of transglutaminase 2 by dihydroisoxazoles. *J Med Chem* 2006;49:7493-501.
12. Xia J, Siegel M, Bergseng E, et al. Inhibition of HLA-DQ2-mediated antigen presentation by analogues of a high affinity 33-residue peptide from alpha2-gliadin. *J Am Chem Soc* 2006;128:1859-67.
13. Salvati VM, Mazzearella G, Gianfrani C, et al. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* 2005;54:46-53.
14. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* 2006;55:469-77.
15. Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:559-75.
16. Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, et al. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:1088-96.

17. Gianfrani C, Siciliano RA, Facchiano AM, et al. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology* 2007;133:780-9.
18. Dhal PK, Holmes-Farley RS, Huval CC, et al. Polymers as drugs. *Adv Polym Sci* 2006;192:9-58.
19. Vachon PH, Beaulieu JF. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 1992;103:414-23.
20. Perreault N, Beaulieu JF. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 1998;245:34-42.
21. Laprise P, Viel A, Rivard N. Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004;279:10157-66.
22. Garneau H, Alvarez L, Paquin MC, et al. Nuclear expression of E2F4 induces cell death via multiple pathways in normal human intestinal epithelial crypt cells but not in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G758-72.
23. Cheng S, Smart M, Hanson J, et al. Characterization of HLA DR2 and DQ8 transgenic mouse with a new engineered mouse class II deletion, which lacks all endogenous class II genes. *J Autoimmun* 2003;21:195-9.
24. Verdu EF, Huang X, Natividad J, et al. Gliadin-dependent neuromuscular and epithelial secretory responses in gluten-sensitive HLA-DQ8 transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G217-25.
25. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, et al. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 1998;275:G1037-44.
26. Biagi F, Luinetti O, Campanella J, et al. Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: do they indicate potential coeliac disease? *J Clin Pathol* 2004;57:835-9.
27. Liang L, Pinier M, Leroux JC, et al. interaction of a  $\alpha$ -gliadin with poly(HEMA-co-SS) : structural characterization and biological implication. *Biomacromolecules* 2008;(in Press).
28. Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, et al. Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World J Gastroenterol* 2005;11:5973-7.
29. Dolfini E, Roncoroni L, Elli L, et al. Cytoskeleton reorganization and ultrastructural damage induced by gliadin in a three-dimensional in vitro model. *World J Gastroenterol* 2005;11:7597-601.
30. Black KE, Murray JA, David CS. HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *J Immunol* 2002;169:5595-600.
31. Insull W, Jr., Marquis NR, Tsianco MC. Comparison of the efficacy of Questran Light, a new formulation of cholestyramine powder, to regular Questran in maintaining lowered plasma cholesterol levels. *Am J Cardiol* 1991;67:501-5.
32. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J Immunol* 2006;176:2512-21.
33. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52:218-23.

34. Khosla C, Gray GM, Sollid LM. Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. *Gastroenterology* 2005;129:1362-3.
35. Gass J, Vora H, Bethune MT, et al. Effect of barley endoprotease EP-B2 on gluten digestion in the intact rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006.
36. Siegel M, Bethune MT, Gass J, et al. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol* 2006;13:649-58.
37. Pyle GG, Paaso B, Anderson BE, et al. Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:687-94.
38. Cornell HJ, Macrae FA, Melny J, et al. Enzyme therapy for management of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:1304-12.
39. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2007;85:160-6.
40. Esposito C, Caputo I, Auricchio S, et al. Tissue transglutaminase and celiac disease. *Prog Exp Tumor Res* 2005;38:158-73.

## 8 Supplementary information

### 8.1 Polymer synthesis

Polymers with varying HEMA to SS molar ratios were synthesized by atom transfer radical polymerization. A di(2-bromo-2-methylpropionate)PEG<sub>44</sub> ( $5 \times 10^{-2}$  mol/L), SS (from  $6 \times 10^{-2}$  to 0.6 mol/L) and HEMA (up to 0.5 mol/L) were dissolved in a 1:3 methanol/water mixture and degassed under argon for 15 min. A solution of 2,2'-dipyridyl and Cu(I)Br was also degassed under argon to reach a final concentration of respectively  $5 \times 10^{-3}$  mol/L and  $11.5 \times 10^{-3}$  mol/L. The cuprous solution was transferred to the monomers under stirring and polymerization was conducted at room temperature. After 24 h, the reactive mixture was exposed to air and turned from a dark-brown color to blue, indicating aerial oxidation of Cu(I) to Cu(II). Purification was achieved by passing the crude polymers through a silica gel column with water as eluent to remove the Cu(II) catalyst. Polymers were then dialyzed (Spectra/Por no.1 molecular weight cut-off 2000 Da) against water for 48 h and then recovered by freeze-drying.

*Polymer characterization*

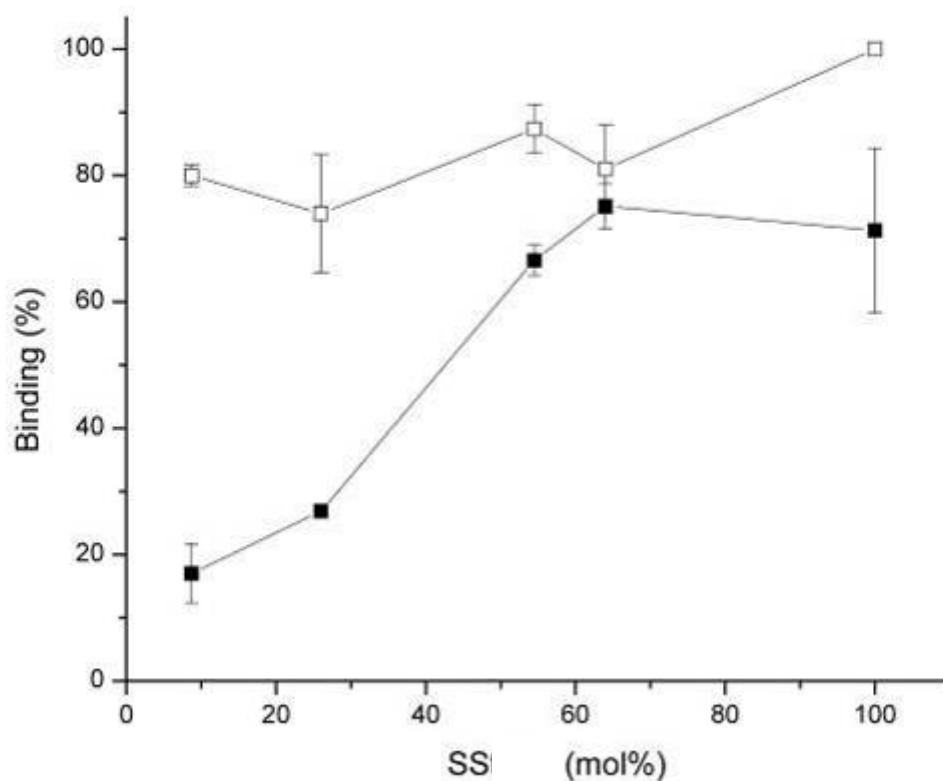


$^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on Bruker AMX300 spectrometer operating at 300 MHz (Bruker, Milton, ON, Canada) in deuterium oxide at 25°C. The copolymer composition was determined from the ratio intensity of the phenyl peak (6.4-7.3 ppm) of SS to that of the methyl peak (0.8-1.2 ppm) of HEMA. The polymer molecular weight was determined by size exclusion chromatography (SEC) with an alliance GPCV 2000 system (Waters, Midford, MA) equipped with a high-sensitivity refractive index detector. SEC measurements were conducted in dimethylformamide containing 10 mM of LiBr at a flow rate of 1 mL/min and a temperature of 40°C. Polymer separation was achieved using 3 Waters Styragel columns in series (HT2, HT3 and HT4). Calibration curves were obtained from near-monodisperse PEG standards (Waters).

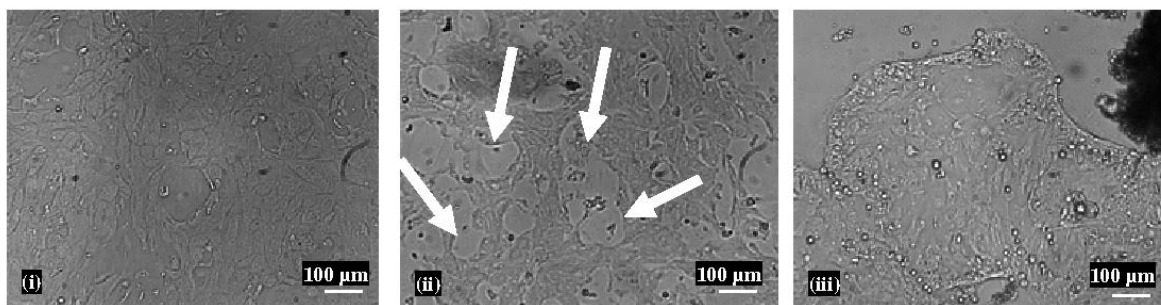
## 8.2 Analysis of gliadin digest

The freeze-dried gliadin digests were resuspended in water and analyzed using a HPLC system equipped with a 1525 Binary pump,  $\text{C}_{18}$  reverse phase column (Sunfire C18, 60 Å, 3  $\mu\text{m}$ ), a 2487 dual wavelength absorbance detector, and a Breeze Chromatography Software (Waters). Samples were eluted at 36°C at a flow rate, detection wavelength, and injection volume of 1 mL/min, 215 nm and 50  $\mu\text{L}$ , respectively. Trifluoroacetic acid (TFA) was used as an ion pairing agent, and elution was performed with gradient consisting in 3 steps spanning over 35 min. From 0 to 2 min, 95% solution A and 5% solution B, from 2 to 10 min 45% solution A and 55% solution B, and equilibration at 45% solution A and 55% solution B for the remaining time. Solution A consisted of 0.1% TFA, 95% water, and 5% acetonitrile while solution B consisted of 0.1% TFA, 5% water and 95% acetonitrile.

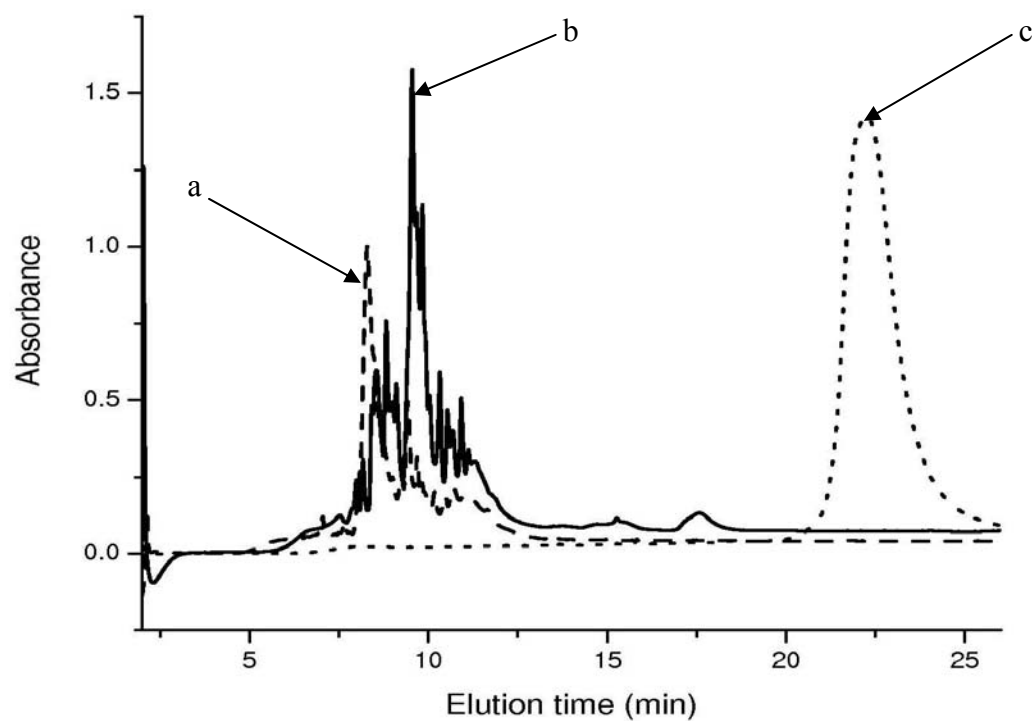
### 8.3 Supplementary figures



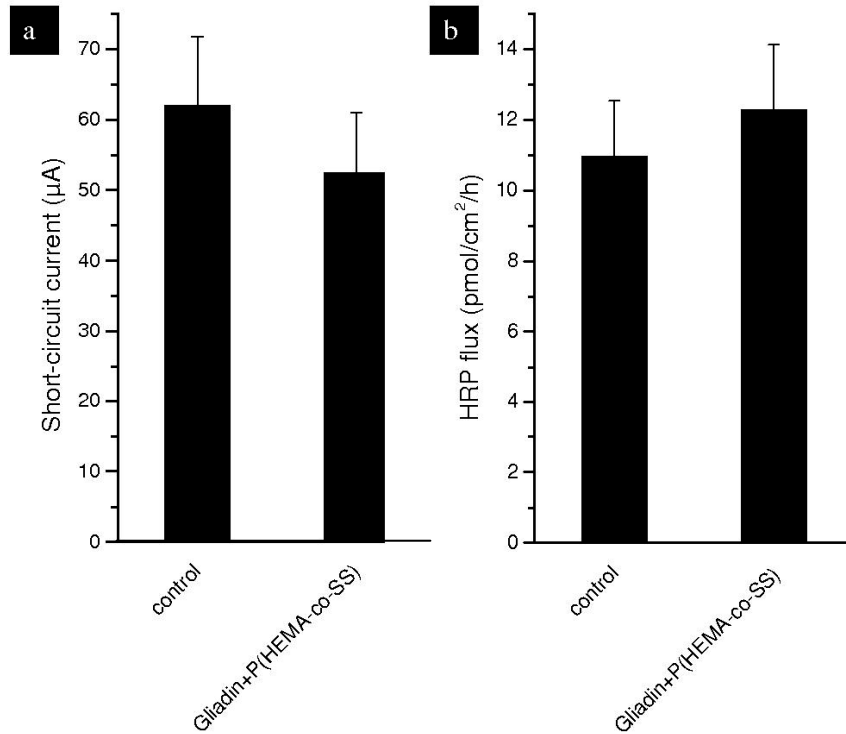
Supplementary Figure 2- 1. Effect of hydroxyethylmethacrylate/styrene sulfonate (HEMA/SS) ratio on gliadin complexation.  $\alpha$ -Gliadin was incubated in pH 6.8 (black square) and pH 1.2 (white square) media with P(HEMA-*co*-SS) (45-65 kDa) of various SS content for 2 h ( $\alpha$ -Gliadin to P(HEMA-*co*-SS) ratio 1:2) After centrifugation, supernatants were loaded on polyacrylamide gel. Following migration, gliadin was stained with coomassie blue and quantified. Values are mean  $\pm$  SD, n=3 experiments.



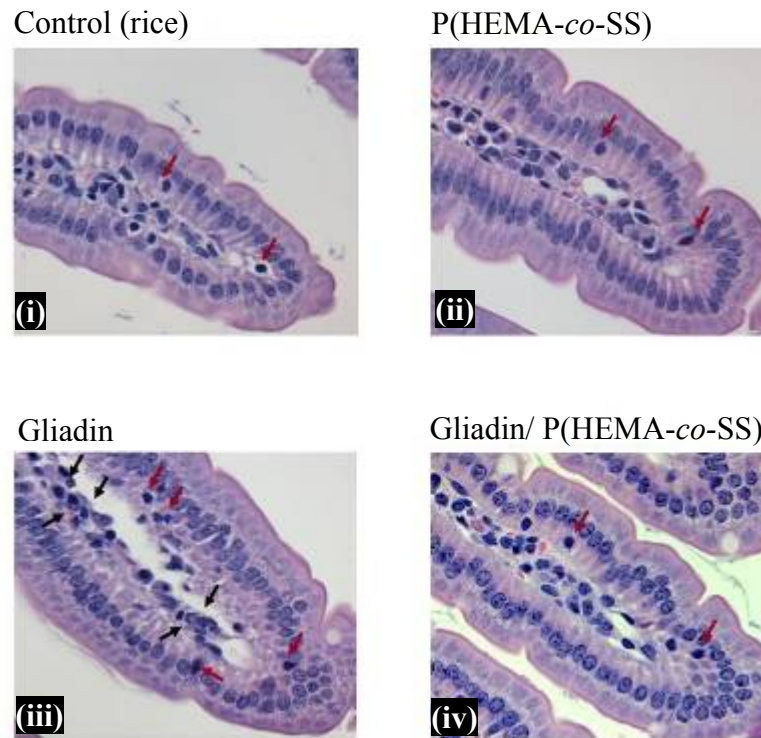
Supplementary Figure 2-2. Effect of gliadin complexation to P(HEMA-*co*-SS) PCDE obtained by Matrisperse<sup>®</sup> treatment. PCDE were incubated for 48 h with 0.5 mg/mL BSA (i), gliadin alone (ii) or in combination with P(HEMA-*co*-SS) at a gliadin/polymer weight ratio of 1:2 (iii). White arrows point disruption in the cell lawn. Data shown are representative of 3 different experiments.



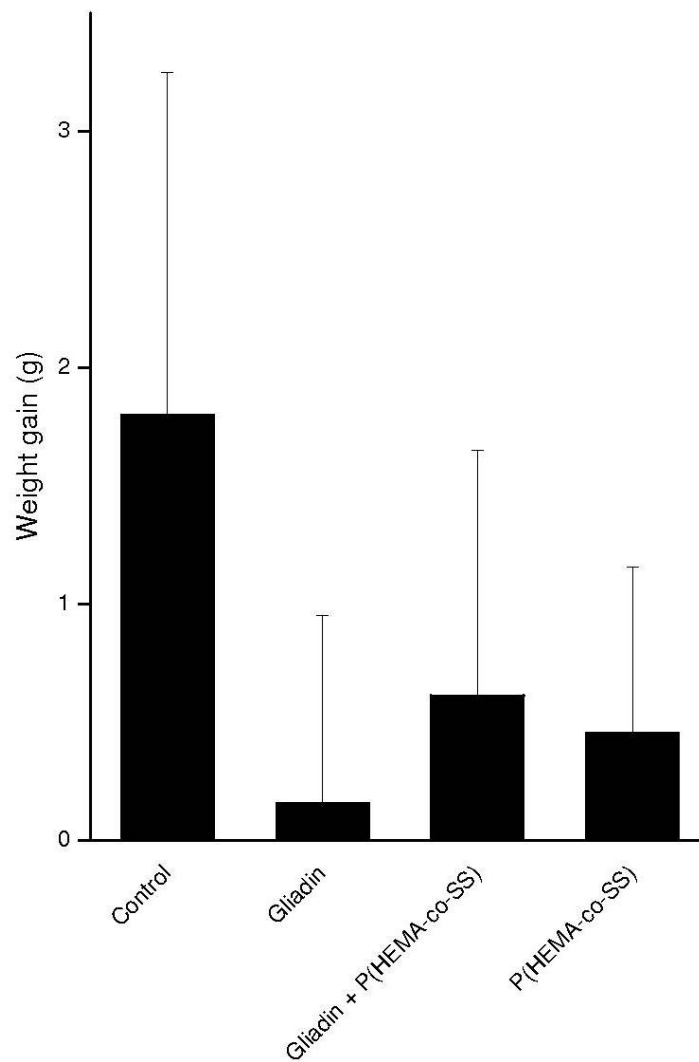
Supplementary Figure 2-3. HPLC traces of  $\alpha$ -gliadin after enzymatic degradation with pepsin, trypsin and chymotrypsin in the presence of P(HEMA-co-SS) at a gliadin /polymer 1:2 (a) or in the absence of P(HEMA-co-SS) (b) and the native gliadin (c).



Supplementary Figure 2-4. Complexation of gliadin with P(HEMA-co-SS) induces no distal epithelial dysfunction. Control mice consisted of non-sensitized mice. Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin and polymer 5 min prior gliadin gavage (n=6-7/group). No difference in baseline ion transport **(a)** and HRP flux **(b)** was found in ileal tissues from control and sensitized mice treated with P(HEMA-co-SS).



Supplementary Figure 2-5. Hematoxylin and eosin stained sections (i) in a non-sensitized mouse gavaged with rice, (ii) non-sensitized mouse gavaged with P(HEMA-co-SS), (iii) gliadin-sensitized mouse gavaged with gliadin, and (iv) gliadin-sensitized mouse gavaged with P(HEMA-co-SS) and gliadin. Gliadin sensitized mice gavaged with gliadin exhibited frequent subepithelial mononuclear infiltrates (black arrows) as well as intra-epithelial lymphocytes (red arrows). Assessment using optical microscopy revealed normal small intestinal morphology in gliadin sensitized mice that had received the polymer alone or in combination with gliadin.



Supplementary Figure 2-6. Control of the weight gain *in vivo* of HLA-DQ8 transgenic mice after 3 weeks. Control mice consisted of non-sensitized mice gavaged with or without P(HEMA-co-SS). Treatment groups consisted of gliadin-sensitized mice gavaged with whole gliadin with or without polymer (n=6-7/group). Administration of P(HEMA-co-SS) did not affect significantly the weight gain within 3 weeks (mean  $\pm$  SD).

Supplementary Table 2- 1. Serum chemistry data. Healthy Balb/c mice were fed with water, PEG or polymer solutions for 22 days at an average polymer dose of 15 mg/day. Values are means of 7 mice  $\pm$  SD.

Chemistry panel	Unit	Control		PEG		P(HEMA- <i>co</i> -SS)	
		Average	SD	Average	SD	Average	SD
<b>Albumin</b>	g/L	30.67	1.37	30.86	0.90	32.29	1.6
<b>ALP</b>	U/L	171.17	5.00	175.86	10.35	175.29	22.10
<b>ALT</b>	U/L	36.83	11.60	33.86	3.34	33.43	8.56
<b>Creatinine</b>	$\mu$ mol/L	23.80	3.07	20.15	3.26	21.36	2.99
<b>Na<sup>+</sup></b>	mmol/L	152.67	2.07	151.71	2.06	153.29	3.68
<b>K<sup>+</sup></b>	mmol/L	5.30	0.74	5.04	0.79	5.59	2.98
<b>Cl<sup>-</sup></b>	mmol/L	112.67	1.03	112.00	2.16	113.29	1.98
<b>Urea</b>	mmol/L	7.28	0.41	7.14	1.14	6.46	0.75
<b>Haematocrit</b>	L/L	0.48	0.02	0.48	0.02	0.49	0.02
<b>Haemoglobin</b>	g/L	156.67	6.62	155.00	3.46	155.43	6.92
<b>Red blood cells</b>	$10^{12}$ /L	10.09	0.52	10.00	0.44	10.21	0.38
<b>MCV</b>	fL	48.0	0.63	48.14	0.69	48.29	0.49
<b>MCH</b>	pg/L	15.53	0.26	15.49	0.43	15.21	0.28
<b>MCHC</b>	g/L	323.83	7.39	322.71	11.97	315.29	4.03
<b>White blood cells</b>	$10^{12}$ /L	2.17	1.00	2.36	0.79	2.40	0.83
<b>Platelets</b>	$10^{12}$ /L	781.33	64.24	779.43	134.47	766.43	88.43

ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine amino-transferase, MCV : mean corpuscular volume, MCH : mean corpuscular haemoglobin, MCHC : mean corpuscular haemoglobin concentration.



## **Chapitre 3 Gluten binders exhibit therapeutic benefits in gluten-sensitive mice and in human tissues**

Maud Pinier<sup>1</sup>, Gregor Fuhrmann<sup>2</sup>, Nathalie Rivard<sup>3</sup>, Joseph A. Murray<sup>4</sup>, Chella S. David<sup>4</sup>, Ludmila Tuckova<sup>5</sup>, Hana Drasarova<sup>5</sup>, Jean-Christophe Leroux<sup>1-2\*</sup>, Elena F. Verdu<sup>6+</sup>.

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada, <sup>2</sup>Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, Switzerland, <sup>3</sup>CIHR Team on Digestive Epithelium, Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada, <sup>4</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine and Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA, <sup>5</sup>Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, <sup>6</sup>Farncombe Family Digestive Health Research Institute, McMaster University, Hamilton, ON, Canada.

\*Corresponding author: Jean-Christophe Leroux

+Co-corresponding author for issues related to the model of gluten sensitivity and human tissues:

Dr. Elena F. Verdu, McMaster University

Conflict of interest: JCL is an inventor of the patent on the use of polymeric binder in treating celiac disease.

In preparation for Journal of Clinical Investigation

## 1 Abbreviations

BSA: bovine serum albumin

CD: celiac disease

CPM: count per minute

CT: cholera toxin

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid.

ESI: electrospray ion

FBS: fetal bovine serum

GFD: gluten-free diet

HEMA: hydroxyethylmethacrylate

HLA: human leukocyte antigen

IL-10: interleukin -10

LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry

MCP-1: monocytes chemotactic protein 1

OD: optic density

P(HEMA-*co*-SS) : poly(hydroxyethylmethacrylate-*co*- styrene sulfonate)

PBS: phosphate buffer saline

P-digest: peptic digest

PT-digest: peptic tryptic digest

SS: styrene sulfonate

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha

## 2 Abstract

Recently, we provided preliminary evidence that a random copolymer of hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and styrene sulfonate (SS) selectively complexed the toxic fraction of gluten, gliadin, *in vitro*. P(HEMA-*co*-SS) prevented the deleterious effects of gliadin on intestinal epithelial cells and on intestinal barrier function in HLA-HCD4/DQ8 mice. Here, we demonstrate that P(HEMA-*co*-SS) hindered whole wheat gluten and barley hordein digestion *in vitro* thereby decreasing the formation of toxic peptides involved in celiac disease (CD). When administered orally to rodents, P(HEMA-*co*-SS) was predominantly excreted in feces, even in the presence of low-grade mucosal inflammation and increased intestinal permeability. In gluten-sensitive mice, P(HEMA-*co*-SS) reduced paracellular permeability and attenuated the immune response to gluten in a food mixture. Furthermore, incubation of mucosal biopsies obtained from patients with CD revealed an immunomodulatory effect of P(HEMA-*co*-SS) when applied together with partially digested gluten. Our data suggest that P(HEMA-*co*-SS) may have a preventive and potentially a therapeutic effect in gluten-induced disorders.

Keywords: Polymeric binder, celiac disease, gluten sensitivity.

## 3 Introduction

Celiac disease (CD) is an inflammatory condition of the small intestine triggered by the ingestion of gluten in genetically susceptible individuals (1). Contrary to previous beliefs, CD is a common disorder with a worldwide prevalence of about 1% (2-6). Genetic predisposition is conferred by Human Leukocyte Antigens (HLA) as 90-95% of affected people exhibit HLA-DQ2 molecules and the remainder, HLA-DQ8 (7). Recent genome-wide association studies have revealed that additional non-HLA genetic factors are involved in CD (8, 9). During the last two decades, tremendous progress has been made towards understanding the pathophysiological processes in CD and its clinical presentation (10, 11). Some patients without villous atrophy, but reporting symptomatic responses to a

gluten-free diet (GFD), are labeled “gluten-sensitive” (12). Both untreated CD and gluten-sensitive patients with low-grade inflammation have an increased morbidity and mortality (13, 14). Thus, a prompt diagnosis and appropriate therapeutic management of these patients is important.

No pharmacological therapies are available to gluten-intolerant patients, and a GFD remains the cornerstone treatment. However, strict gluten restriction for life is far from simple, since it can carry significant psychosocial and financial burden (15, 16). Non-adherence to a GFD is common because gluten is often used as an additive in processed foods (17). Therefore, complementary therapeutic options are required. Several attractive strategies are currently under investigation and some of these are already being tested in clinical trials (18). Research is being carried out to develop celiac-safe wheat by enzymatic treatment (19) or by wheat gene modulation (20) and bacterial fermentation (21, 22). Another strategy, using oral exogenous enzyme intake, aims at reducing gluten toxicity by cleaving immunogenic peptide sequences prior to gluten ingestion or directly in the gut lumen (23-25). Modulators of the permeability have been developed to diminish uptake of gluten peptides into the gastrointestinal mucosa (26, 27). Other experimental therapies include restoration of oral tolerance by administration of gluten peptides secreted by *Lactococcus* (28) and immuno-modulation by helminths (29). Finally, tissue transglutaminase inhibitors (30, 31) to prevent peptide selective deamidation, HLA-DQ groove antagonists (32) to block the T-CD4 lymphocyte recognition, and inhibitors of adhesion molecules to hinder inflammatory cell recruitment (29), are also under development.

We have recently explored a novel approach to block gluten toxicity, which relies on the use of the polymeric binder, poly(hydroxyethyl methacrylate-*co*-styrene sulfonate) (P(HEMA-*co*-SS)). Such an approach could prove useful as a supportive therapy for CD when the gluten-free quality is not ascertained or when gluten exposure is low (a few mg). Polymeric binders are employed in various clinical disorders to sequester compounds in the gastrointestinal tract (33). We have previously shown that P(HEMA-*co*-SS) can complex  $\alpha$ -gliadin (the gluten protein fraction predominantly involved in CD) in a relatively selective

fashion. The binder was found to be efficient to counteract the toxic effects of gliadin on intestinal epithelial cells *in vitro*. P(HEMA-*co*-SS) also reduced the jejunum mucosal toxicity induced by oral gavage of isolated gliadin in mice that had been systemically sensitized with gliadin. Besides, complementary experiments on the ileum mucosa suggested that the deleterious effects of gliadin did not occur farther down in the gastrointestinal tract in the presence of P(HEMA-*co*-SS). Furthermore, these studies indicated no detectable adverse effects, even at high doses (34). In this manuscript, we provide evidence that P(HEMA-*co*-SS) has potential for the treatment of gluten-induced disorders by decreasing the formation of pathogenic peptide sequences. The efficacy of P(HEMA-*co*-SS) was tested by measuring jejunum permeability parameters, the mucosal and systemic immune activation after administration of whole wheat gluten/food mixture to orally gluten-sensitized mice. We further showed that the polymer remains mainly in the gastrointestinal tract as it is almost completely recovered in the feces. Lastly, the capacity of P(HEMA-*co*-SS) to reduce the production of immunogenic gluten peptides was established by measuring cytokine secretion in mucosal biopsies of patients with CD.

## 4 Results

### 4.1 P(HEMA-*co*-SS) decreases the formation of gluten-derived toxic peptides

P(HEMA-*co*-SS) was synthesized as previously described (34). Gliadin, gluten and barley hordein were subjected to *in vitro* digestion by gastrointestinal enzymes in the presence or absence of P(HEMA-*co*-SS), and the digestion products analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). This *in vitro* test was used to provide insight on the polymer's mechanisms of action. It is semi-quantitative and represents a worst-case experimental set-up as the cereal proteins are the sole substrates for digestive enzymes, which is not the case in the gastrointestinal tract. As reported in our first study (34), incubation of gliadin with P(HEMA-*co*-SS) resulted in a decrease of the overall abundance of generated peptides. Here, we demonstrate that P(HEMA-*co*-SS) greatly reduced (by 70%) the formation, from isolated gliadin, of the 13-mer peptide LGQQQPFPPQQPY,

which is involved in the innate immune response (7) (Fig. S3-1). Since both gliadin and glutenin are involved in CD pathogenesis (1, 35-37) further investigation were performed on whole wheat gluten digests. The analysis of LC-MS traces showed that the signal intensities associated with the peptide YPTSPQQSGQGQQL (1) and the peptide LQPQQPFPQQPQQPFPQ, bearing the  $\gamma$ -2 gliadin epitope (QQPFPQQPQQPFPQ) (38), were reduced by 70% and 25-30%, respectively (Figs. S3-2A-B). This observation is of special interest since those sequences are reported to be recognized by T-cell and T-cell clones from patients suffering from CD (1, 38).

In addition, the production of a gluten sequence, known to bind to the HLA-DQ2 receptor (*i.e.* QLQFPQPQLPY) (39), was also reduced by 50-70% in the presence of P(HEMA-co-SS) (Fig. 3-1A). Besides, the formation of PQPQLPYPQPQLPYPQPQPF decreased significantly (Fig. 3-1B). When combined, these 2 peptides (QLQFPQPQLPY and PQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) almost completely make up the known 33-mer sequence (LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF), one of the identified initiators of the inflammatory reaction in CD patients (1, 40). Besides, glutenin sequence (*i.e.* SQQQQPPF) was also decreased by 60% (Fig. S3-2C).

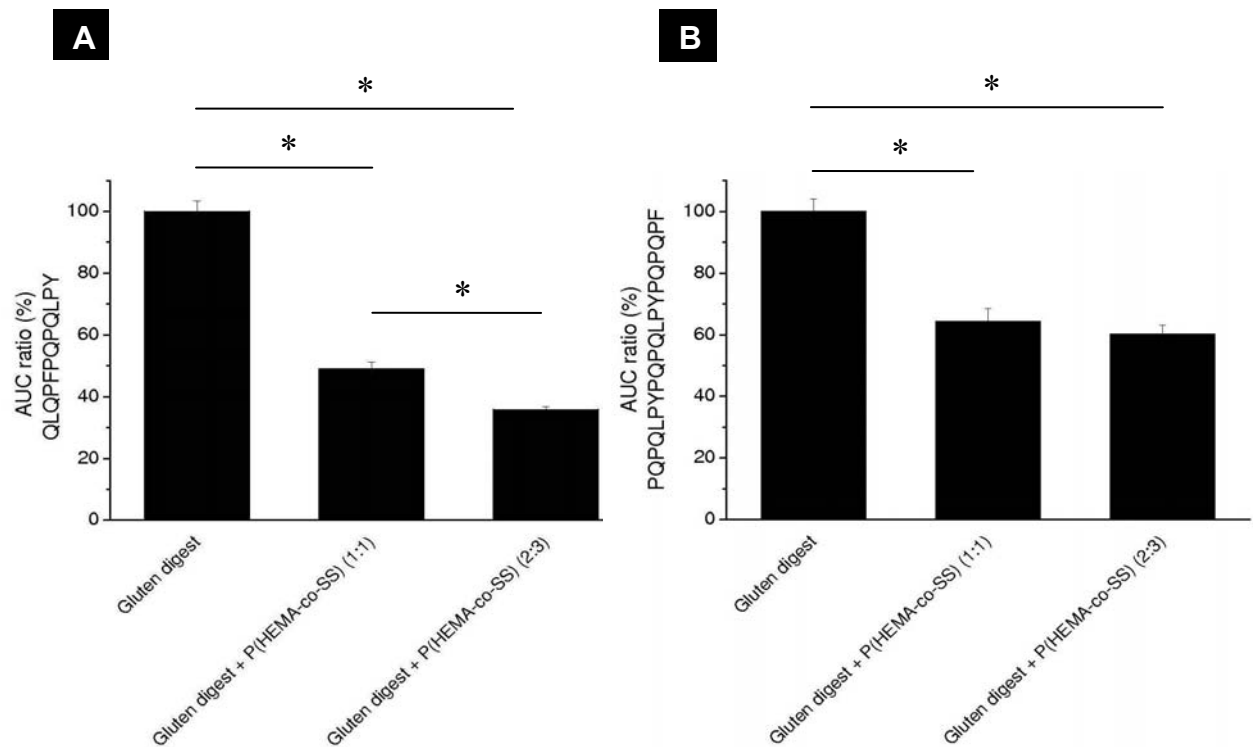


Figure 3-1. P(HEMA-*co*-SS) decreases the formation of peptides QLQPFPPQQLPY (**A**) and PQQQLPYPQQLPYPQQPQPF (**B**) from wheat gluten. Digested gluten samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gluten digest in the absence of P(HEMA-*co*-SS). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.001$ .

To test whether the P(HEMA-*co*-SS) could reduce the production of dominant immunogenic peptides from prolamine of barley, complementary analysis with hordein digests were performed. The formation of PQQPFPPQQPFPQQPPFW, bearing a 9-mer (QQPFPPQQPF) sequence, predicted to be a HLA-DQ2 restricted T-cell epitope (41), was reduced by 40-45% (Fig. S3-3A). More importantly, 2 sequences, PQQPQQPFPFQPQQPFRQ and PQQPFPQQPQQPFPQPQQPF (38), reported to stimulate T-cell and T-cell clone from patients suffering from CD (1, 38), were decreased by 40-45%

and by 60-65%, respectively (Figs. S3-3B-C). Finally, a peptide from  $\gamma$ -hordein (LERPQQLFPQWQPLPQQPPFL) exhibited a drastic reduction by 85-90% (Fig. S3-3D).

## 4.2 P(HEMA-*co*-SS) is poorly absorbed and mainly excreted in feces

The oral absorption of the polymeric binder and its excretion profiles were first examined in Sprague-Dawley rats after single and chronic dosing. The non-fasted animals were gavaged with [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS), and blood, feces and urine collected and assayed for radioactivity content over 72 h. Following the animal euthanasia, selected organs were harvested and the radioactivity levels measured. After a single polymer intake (150 mg/kg), the amount of radioactivity found in the blood over 72 h was very low, reflecting poor absorption of P(HEMA-*co*-SS) (Fig. S3-4A). Part of the radioactivity detected might not be associated with P(HEMA-*co*-SS), but reflect some tritium exchange with protons. Indeed, about 98% of the total radioactivity was recovered in the feces. The total amount excreted in the urine was less than 2% of the total dose. The radioactivity found in the urine may also have come from their contamination by the feces in the metabolic cages. Only residual P(HEMA-*co*-SS) activity was detected in harvested organs (Figs. S3-4B-D). Similar results were obtained after a 3-week administration of P(HEMA-*co*-SS) at a dose of  $\sim 100$  mg/kg/day, suggesting no permeabilization of the intestinal mucosa upon protracted dosing (Fig. S3-5).

To determine whether the absorption of the polymer would be increased by mucosal inflammation and changes in intestinal permeability triggered by gluten (42, 43), [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) was also administered to non-sensitized and gluten-sensitized HLA-HCD4/DQ8 mice. The amount of tritium recovered in the feces exceeded 93% of the total radioactivity and was comparable in gluten-sensitized and non-sensitized mice (Fig. 3-2A). After 72 h, less than 1.2% of the administered dose was detected in the urine (Fig. 3-2B). Likewise, the radioactivity levels in the blood, liver and kidney remained similar to background levels (overall amount 0.1% of given dose) (Fig. 3- 2C).



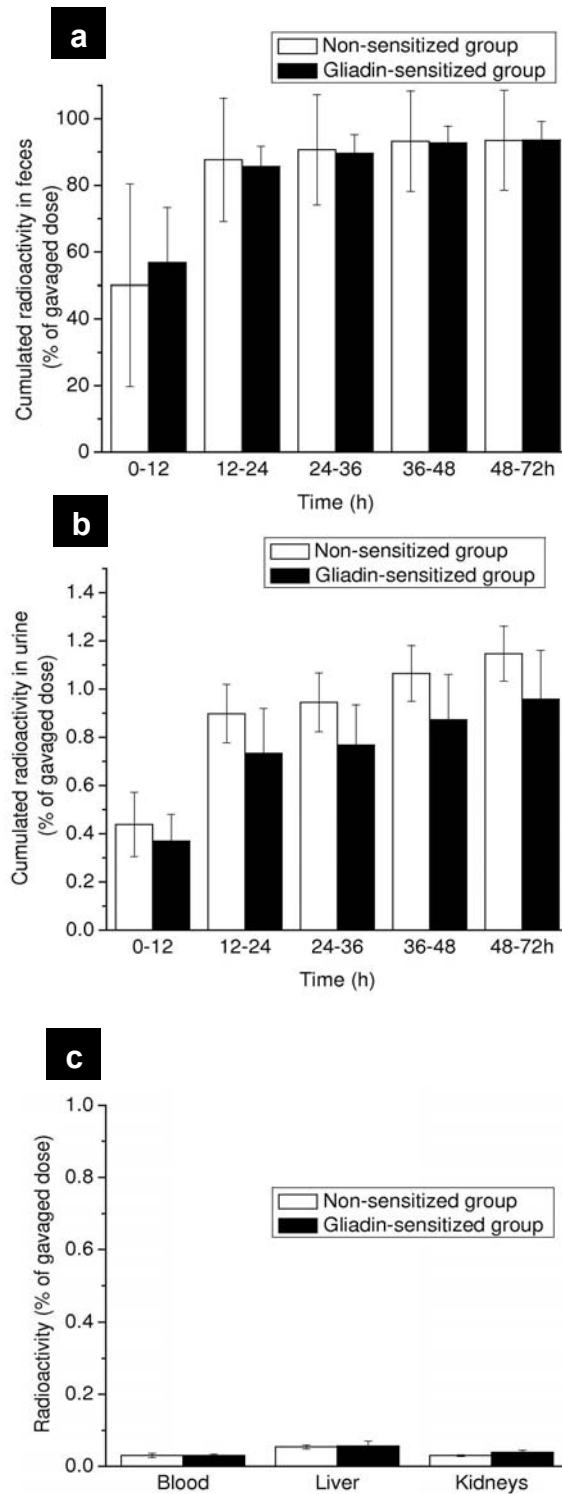


Figure 3-2. P(HEMA-co-SS) is poorly absorbed and mainly excreted in the feces. Biodistribution and excretion profiles of  $[^3\text{H}]\text{-P(HEMA-co-SS)}$  in non-sensitized (white bars) and gluten-sensitized (black bars) HCD4-DQ8 mice after single oral dosing (240

mg/kg, 22.4  $\mu$ Ci/kg) (n=4/group). (a) Cumulative dose excreted in feces, (b) cumulated dose excreted in urines, (c) blood, liver and kidney levels at sacrifice (Mean  $\pm$  SD).

### **4.3 P(HEMA-*co*-SS) reduces mucosal dysfunction in gluten-sensitive mice when administered in a gluten-containing meal**

To evaluate the therapeutic relevance of the polymeric binder toward a gluten containing meal, an *in vivo* assay was performed on gluten-sensitive HLA-HCD4/DQ8 mice. These mice exhibit increased intestinal permeability and mild mucosal immune activation after gluten or gliadin sensitization (34, 42, 43). We previously reported that P(HEMA-*co*-SS) reversed intestinal barrier abnormalities induced by isolated gliadin (34). However, in the previous study no other food components were admixed with gliadin, and it was not demonstrated whether the binder was efficient in the presence of whole gluten. Therefore, we measured the activity of P(HEMA-*co*-SS) in gluten-sensitive mice using a mixture of wheat gluten, bovine serum albumin (BSA) and starch. HLA-HCD4/DQ8 mice gavaged with the food mixture exhibited an increase in  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux, a marker of paracellular permeability (Fig. 3-3A), and in intestinal tissue conductance (Fig. 3-3B), compared to control mice receiving the BSA/starch mixture alone. The gluten-induced effects on conductance and paracellular permeability were normalized in mice treated with P(HEMA-*co*-SS) (gluten/polymer 1:2 w/w, 2 mg of gluten), 5 min prior to the food gavage. Thus, P(HEMA-*co*-SS) decreased gluten-induced effects on barrier function in HLA-HCD4/DQ8 mice even in the presence of additional food components, thereby indicating an efficient neutralization of wheat whole gluten under more complex *in vivo* conditions. At a lower polymer dose (gluten/polymer 2:1 w/w, 2 mg of gluten), the same trend was observed, although statistical significance could not be achieved (Fig. 3-3 last bar). This was also true when the dose of polymer was kept unchanged but the amount of wheat gluten was doubled (gluten/polymer 1:1 w/w, 4 mg of gluten) (Fig. S3-6). Thus, further investigations were performed at a gluten to polymer ratio 1:2 w/w (2 mg of gluten).

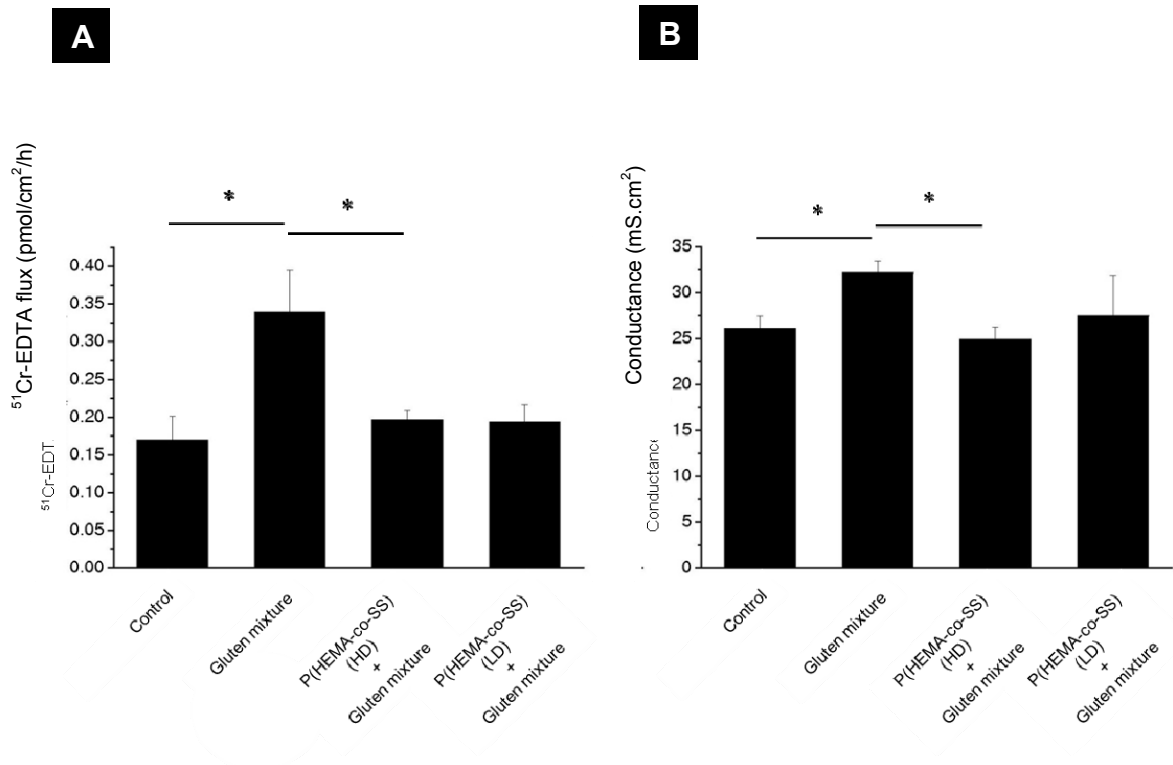


Figure 3-3. Administration of P(HEMA-co-SS) to gluten-sensitized HCD4/DQ8 mice challenged with wheat gluten mixture decreased (A)  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability) and (B) intestinal tissue conductance compared to untreated gluten-sensitized mice. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch (n=8-10); gluten mixture group: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch (n=8-10); P(HEMA-co-SS) (HD, high dose) + gluten mixture group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-co-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch (gluten/polymer 1:2 w/w) (n=8-10); P(HEMA-co-SS) (LD, low dose) + gluten mixture group (second treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-co-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch (gluten/polymer 2:1 w/w) (n=4). Mean  $\pm$  SEM, \*p  $\leq$  0.011.

#### 4.4 P (HEMA-*co*-SS) reduces the gluten-induced mucosal and systemic immune response in gluten-sensitive mice

To investigate whether the P(HEMA-*co*-SS) affected anti-gliadin IgA levels, supernatants of intestinal washes of HLA-HCD4/DQ8 mice were collected. Total anti-gliadin IgAs were increased by 2.4 fold in gluten-sensitized mice compared to non-sensitized controls (Fig. 3-4A). In mice receiving P(HEMA-*co*-SS) prior to gluten-food mixture challenge (gluten/polymer 1:2 *w/w*), the IgA levels were comparable to those observed in non-sensitized mice. The ability of oral P(HEMA-*co*-SS) to modulate systemic immune responses was examined using a splenocyte proliferation assay. Splenocytes from gluten-sensitized HLA-HCD4/DQ8 mice (subsequently gavaged with gluten-food mixture +/- P(HEMA-*co*-SS)) and from non-sensitized controls were harvested and incubated with a peptic tryptic digest of gliadin (PT-gliadin). Negative controls from all groups were incubated with medium alone, and positive controls with concanavalin A (ConA) (5  $\mu$ g/mL). Proliferation index of splenocytes incubated with medium alone was low and comparable in all groups. ConA-stimulated proliferation was robust and similar in all groups (controls:  $17.2 \pm 3.4$ , gluten:  $16.7 \pm 5.3$ , gluten + P(HEMA-*co*-SS):  $19.4 \pm 3$  CPM). After incubation with PT-gliadin, gluten-sensitized mice had increased thymidine incorporation compared to non-sensitized controls (Fig. 3-4B). However, splenocytes from gluten-sensitized mice that were treated with P(HEMA-*co*-SS) before the gluten-food mixture gavage, exhibited reduced thymidine incorporation *versus* sensitized mice that had not received P(HEMA-*co*-SS). To further characterize the immuno-modulatory effect of P(HEMA-*co*-SS), supernatants from splenocyte cultures stimulated with PT-gliadin were assayed for IL-10, TNF- $\alpha$  and MCP-1. Previous studies in HLA-HCD4/DQ8 mice have shown increases in the immuno-regulatory cytokine IL-10 (42-44). Our results were in line with these previous studies demonstrating enhanced IL-10 production after mucosal gluten sensitization (Fig. 5A). Administration of P(HEMA-*co*-SS) before the gluten-food mixture challenge led to a more pronounced IL-10 secretion *in vitro* (Fig. 3-5A). The pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  was increased in gluten-sensitized mice compared to non-sensitized controls. P(HEMA-*co*-SS) administration before the gluten-food mixture challenge reduced TNF- $\alpha$  secretion by 55% (Fig. 3-5B). In gluten-sensitized mice

challenged with the gluten-containing mixture and treated with P(HEMA-*co*-SS), the TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio dropped from 2.3 to 0.5 *versus* control group. Non-sensitized mice had low levels of MCP-1, a chemokine that prolongs lymphocyte survival (Fig. 3-5C). Untreated gluten-sensitized mice exhibited higher levels of MCP-1 than controls and than gluten-sensitized mice treated with P(HEMA-*co*-SS) (Fig. 3-5C).

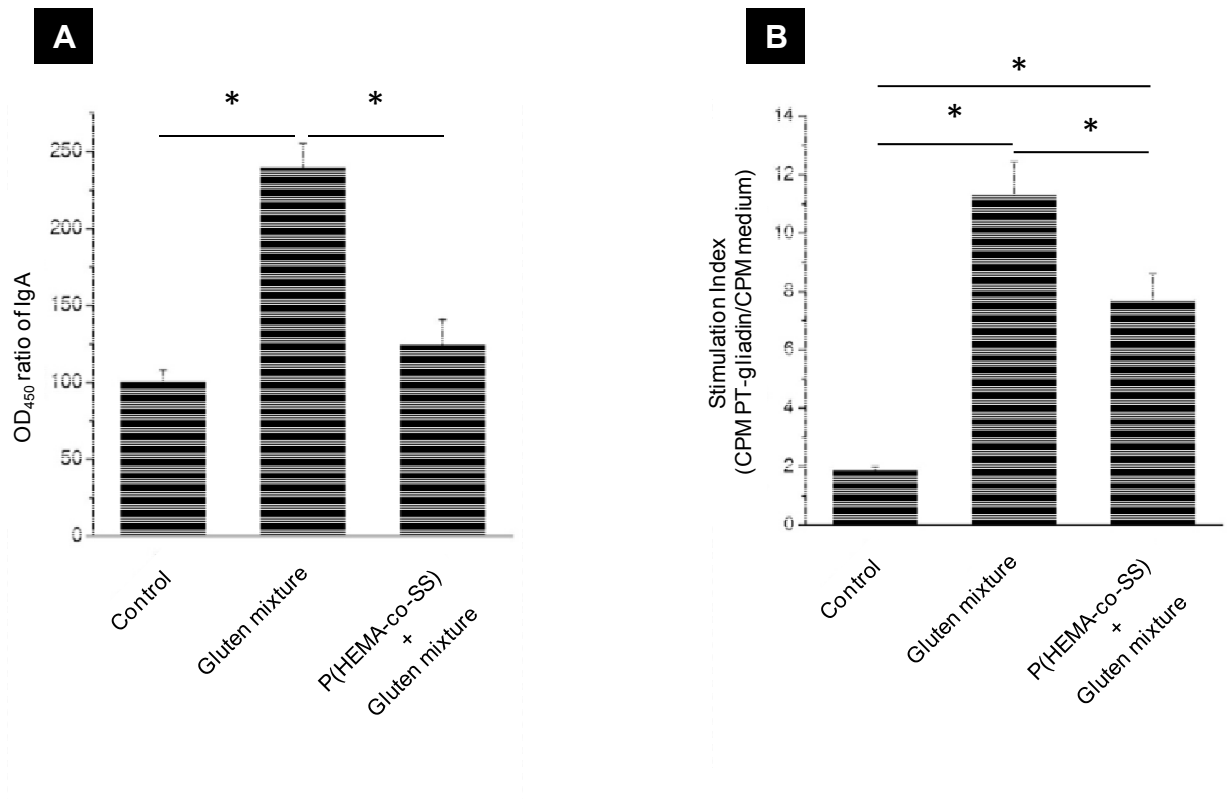


Figure 3-4. Administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized HCD4/DQ8 mice challenged with gluten-food mixture modulated mucosal (A) and systemic (B) immune responses. Gluten sensitization and gluten-food mixture challenge to HCD4/DQ8 mice increased OD levels for anti-gliadin IgA in intestinal washes. In gluten-sensitized mice, P(HEMA-*co*-SS) returned IgA levels to control values. The control group was used as reference (100% optical density at 450 nm, OD<sub>450</sub>). Mean ± SEM, (n= 8-10/group), \*p < 0.005 (A). Administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized mice challenged with gluten-food mixture reduced splenocyte proliferation after incubation with PT-gliadin. Data represent the stimulation index from mean [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation for triplicate cultures. Mean ± SEM (n=8-10/ group), \*p ≤ 0.001 (B). Controls: non-sensitized mice

gavaged with BSA and starch; gluten mixture group: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch; P(HEMA-*co*-SS) (gluten/polymer 1:2 w/w) + gluten mixture group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch.

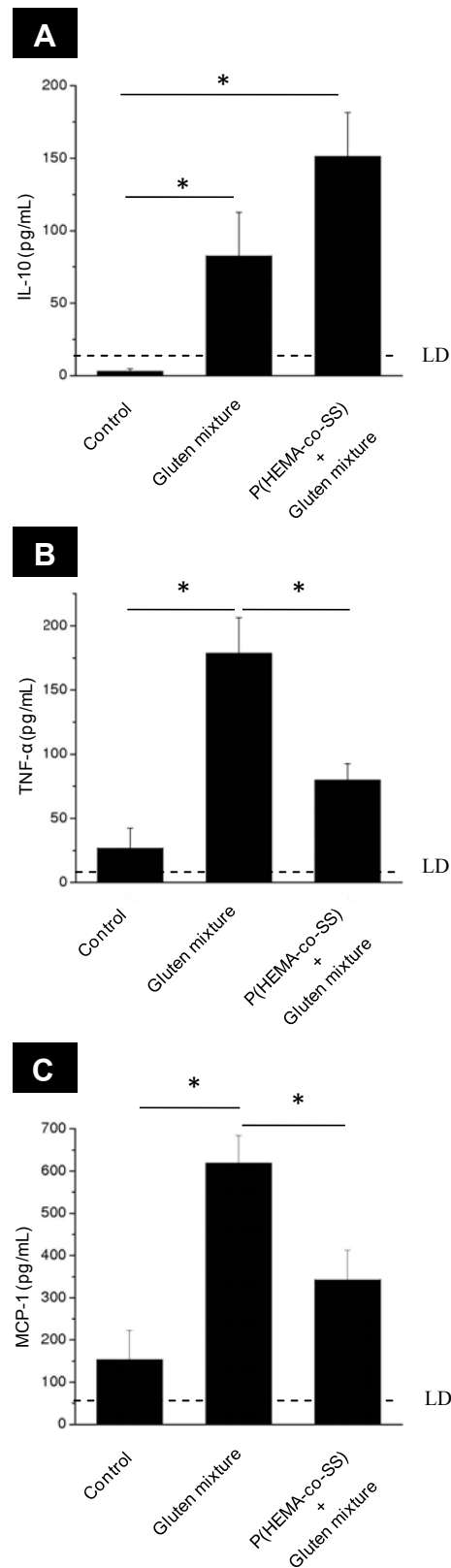


Figure 3-5. Modulation of cytokine production in splenocyte culture supernatants after PT-gliadin incubation: (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$  and (C) MCP-1. IL-10 secretion was increased in

gluten-sensitized mice compared to controls. Administration of P(HEMA-*co*-SS) (gluten/polymer 1:2 *w/w*) to gluten-sensitized mice led to lower TNF- $\alpha$  and MCP-1 levels in culture supernatants after PT-stimulation. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch; gluten mixture: gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch; P(HEMA-*co*-SS) + gluten mixture (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-*co*-SS) and subsequently with gluten/BSA/starch. Mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10/\text{group}$ ),  $*p \leq 0.01$ . In culture supernatants from the splenocytes incubated with medium alone, cytokines were below the limit of detection (LD; dotted line) ( $\text{LD}_{\text{IL-10}} = 17.5 \text{ pg/mL}$ ;  $\text{LD}_{\text{TNF-}\alpha} = 7.3 \text{ pg/mL}$ ;  $\text{LD}_{\text{MCP-1}} = 52.7 \text{ pg/mL}$ ).

#### **4.5 P(HEMA-*co*-SS) affects cytokine release by biopsies from CD patients**

The effect of P(HEMA-*co*-SS) on gliadin digestion was evaluated on mucosal biopsies obtained from CD patients. Two series of experiments were conducted. In the first case, the gliadin peptic digest (P-gliadin) was generated in the presence or absence of the polymer to mimic a rapid complexation in the stomach (Fig. 3-6). In the second case, P-gliadin was first produced and then admixed to the polymer, in order to simulate a situation where complexation would occur at a later stage when a substantial amount of gluten would have been digested (Fig. S3-7). In both cases, the gliadin samples were incubated with the isolated mucosa and the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-10 was measured in the culture supernatant. As shown in Fig. 3-6 and Fig. S3-7, negative controls (non-stimulated biopsies) released traces of TNF- $\alpha$  ( $< 15.62 \text{ pg/mL}$ ) and IL-10 ( $< 31.25 \text{ pg/mL}$ ). The addition of the P-gliadin in the medium increased the production of those cytokines, especially of TNF- $\alpha$ . Biopsies incubated with P(HEMA-*co*-SS) alone secreted traces of TNF- $\alpha$ , suggesting that P(HEMA-*co*-SS) applied to the intestinal mucosa is not pro-inflammatory *in vitro*. The incubation of the biopsies with P-gliadin/P(HEMA-*co*-SS) mixture (digestion of gliadin before the addition of the polymer, Fig. S3-7) seemed to reduce TNF- $\alpha$ , while IL-10 concentrations remained unchanged. The effect was greater when the intestinal tissues were incubated with the digested gliadin/P(HEMA-*co*-SS) complex (Fig. 3-6) where TNF- $\alpha$  levels were reduced to very low levels ( $< 15.62 \text{ pg/mL}$ ).



These striking results indicate that P(HEMA-*co*-SS) can modulate cytokine secretion in biopsies from CD patients. This down-regulation of TNF- $\alpha$  secretion strongly suggests a potential therapeutic benefit of P(HEMA-*co*-SS).

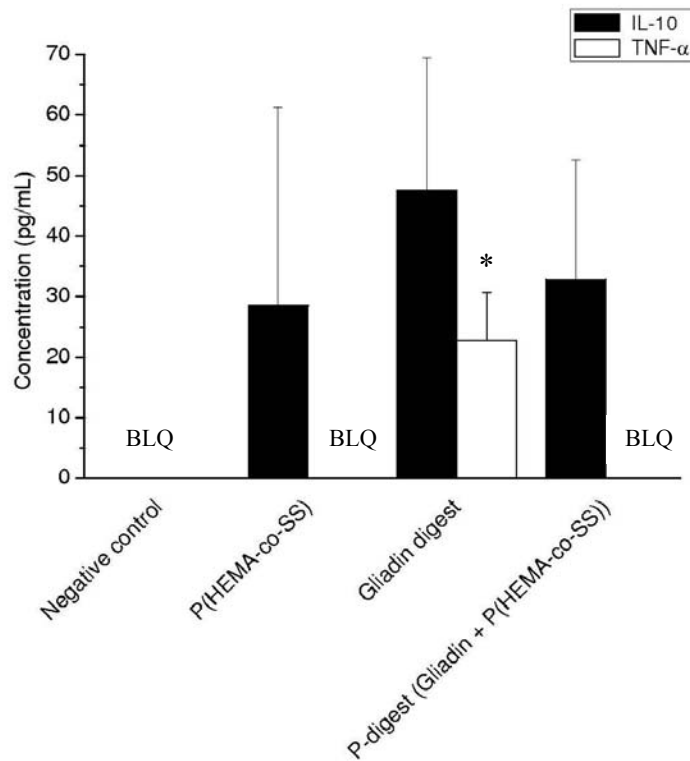


Figure 3-6. Incubation with P(HEMA-*co*-SS) abolished gliadin-induced TNF- $\alpha$  secretion (white bars) in culture supernatants of biopsies from CD patients. P(HEMA-*co*-SS) alone or in P-digest did not affect gliadin-induced IL-10 secretion (black bars). The negative control corresponds to biopsies incubated with medium only. Mean  $\pm$  SEM (n=4), \*p $\leq$ 0.05. BLQ: below limit of quantification (< 31.25 pg/mL for IL-10 and < 15.62 pg/mL for TNF- $\alpha$ ).

## 5 Discussion

In this paper, we report important findings regarding the *in vivo* biodistribution and therapeutic efficacy of P(HEMA-*co*-SS) when administered orally in a mixture containing whole gluten from wheat and other food components to rodents. We also determined its effect on cytokine production by mucosal biopsies of CD patients upon gliadin stimulation. Our results demonstrate that P(HEMA-*co*-SS) hindered significantly the formation of major immunogenic peptides from wheat gluten (such as QLQPFPPQLPY and LQPQQPFPPQQPFPPQ) (38, 39), (Figs. 3-1 and S3-2) by gastrointestinal enzymes. Besides, we report that P(HEMA-*co*-SS) also decreased the production of immunogenic peptides from barley implicated in CD (Fig. S3-3). At this stage it is unknown whether the degree of inhibition of peptide formation achieved *in vitro* can be directly correlated to the *in vivo* efficacy, as the mechanism of action of the binder might be more complex than initially expected and could involve some modulation of the immune response. For highly sensitive patients who respond to very low levels of immunogenic peptides, the polymeric binder could be combined with other therapeutic strategies (*i.e.* modulation of the intestinal permeability, desensitization, etc.).

Pharmacokinetic and biodistribution experiments demonstrated that the polymer was not absorbed systemically (Fig. 3-2, and Figs. S3-4 and S3-5). Similarly to the oral enzymatic approach, P(HEMA-*co*-SS) reduces gluten toxicity. However, these two complementary strategies differ in their mechanism of action. The former cleaves the pathogenic peptides into less immunogenic smaller fragments while the latter is aimed at protecting gluten from digestion by gastrointestinal enzymes, thereby excreting it with few toxic by-products. The oral administration of P(HEMA-*co*-SS) to gluten-sensitized HLA-HCD4/DQ8 mice ameliorated mucosal and systemic consequences of an oral gluten challenge that was admixed with other proteins and polysaccharides. In mice, P(HEMA-*co*-SS) restored gluten-induced intestinal barrier dysfunction and paracellular permeability, reduced the levels of anti-gliadin IgA in intestinal washes, decreased the proliferation of splenocytes incubated with PT-gliadin and shifted the immune response *in vitro* towards an immunoregulatory balance. More importantly, our results showed that P(HEMA-*co*-SS) has the

capacity to modulate cytokine production in response to gliadin in mucosal biopsies of patients with CD.

Innate and adaptive immune responses are involved in the pathogenesis of CD. The intestinal epithelial uptake of gliadin has been extensively studied in the context of CD (45-47). Gliadin has been reported to increase intestinal permeability enabling its paracellular diffusion, thereby subsequently triggering an interaction with the mucosal immune system (45, 46). Gliadin peptides can also translocate transcellularly by the recently described transferrin receptor (47). This translocation makes poorly digested gliadin available to the mucosa, leading to antigen presentation of HLA-DQ2/DQ8-bound gliadin peptides to CD4<sup>+</sup> T-cells, and to the generation of effector cells (48, 49). Increased availability of gliadin and its by-products in the mucosa and impairment of immuno-regulatory mechanisms that control oral tolerance have been proposed as mechanisms that lead to autoimmune enteropathy in CD (50). In our study, treatment of gluten-sensitized mice with P(HEMA-*co*-SS) led to a reduction in anti-gliadin IgA in intestinal secretions. Oral P(HEMA-*co*-SS) also led to increased production of IL-10, and to decreased production of MCP-1 and TNF- $\alpha$  by splenocytes after *in vitro* stimulation with PT-gliadin. The mechanism leading to the increase of IL-10 expression by splenocytes remains to be investigated. It can be hypothesized that the complexation of the binder to gluten, in addition to hindering its degradation, may also change the immune response to gluten peptides. For example, recent work reported that the conjugation of mannoside units to BSA could increase IL-10 expression by CD4<sup>+</sup> cell type 1 regulatory-like cells and induce oral tolerance in a mouse model of food allergy (51).

In line with the observations in mice, an increase in IL-10 expression was observed in human biopsies obtained from CD patients that were incubated with gliadin. P(HEMA-*co*-SS) seemed to reduced (Fig. S3-7) or abolished (Fig. 3-6) gliadin-induced TNF- $\alpha$ , but not IL-10 production. The IL-10 production observed in human biopsies in the presence of P(HEMA-*co*-SS), even without gliadin stimulation, is interesting in view of previous studies showing that recombinant IL-10 can suppress gliadin-dependent T-cell activation in mucosal T-cells obtained from CD patients (52). Clinical studies using the polymeric

binder will be crucial to determine the biological effect of such *in vitro* observation. Collectively, the data support a potential therapeutic benefit of this polymer strategy in gluten-sensitive disorders.

Polymeric binders are commonly used to sequester compounds (*e.g.* bile salts, phosphate) in the gastrointestinal tract. They are designed not to be absorbed in order to minimize the risks of systemic toxicity (53). P(HEMA-*co*-SS) has a high molecular weight (45 kDa) and carries multiple negative charges. Furthermore, upon complexation with gliadin, particle sizes in the order of hundreds nanometers are obtained (54). Therefore, P(HEMA-*co*-SS) was not expected to be orally bioavailable (55). Our *in vivo* data in both rats and mice support this hypothesis. Most of the administered P(HEMA-*co*-SS), whether given as a single dose or in a chronic fashion, was recovered in the feces after 3 days. There was some residual radioactivity found in the blood and in urine, which could be due to tritium exchange or urine contamination by the feces. The lack of absorption of P(HEMA-*co*-SS) supports our previous findings of no systemic toxicity as well as no alteration of several biochemical and cellular markers even with chronic administration of high doses (34). The fact that P(HEMA-*co*-SS) absorption was not increased in gluten-sensitized mice, which are known to exhibit changes in intestinal permeability and low-grade inflammation, further supports the safety profile of the binder. Moreover, the direct action in the gastrointestinal tract, bypassing bioavailability issues, might be a tremendous advantage of this strategy.

In conclusion, these data strengthen the evidence in support of luminal gluten-polymeric binder as an effective adjunctive therapy to a GFD. The polymer was not systemically absorbed and blocked mucosal toxicity of gluten in mice, likely by decreasing the production of immunogenic peptides in the gastrointestinal tract and by limiting the absorption of gluten by-products. Taken in conjunction with the animal studies, the immuno-modulatory effects seen in tissues from CD patients should encourage future work aiming at assessing the safety of P(HEMA-*co*-SS) after oral administration to healthy volunteers and progression into phase I clinical trials. The ultimate verdict on therapeutic efficacy and utilization guidelines of P(HEMA-*co*-SS) will only come from clinical studies. Currently, the only life-long treatment of CD is a strict GFD, which is difficult personally

and socially, affects quality of life, is not widely available and is expensive (16, 17). Together, these factors lead to low compliance to GFD. Therefore, there is an urgent need for alternative therapeutic and/or adjuvant modalities. Research on numerous adjuvant approaches to a GFD should be encouraged, as a combination of alternative therapies may result to be the best approach for patients with poorly controlled CD.

## 6 Acknowledgements

We are grateful to Dr. H. Tlaskalova for scientific discussions and to J. Cinova, J. Juri, Xianxi Huang, F. Plourde and K. Fuhrmann for technical help. Financial support from the Canadian Celiac Association, the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), the Canadian Association of Gastroenterology (CAG)/Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Canada Research Chair program are acknowledged. M. Pinier is a recipient of Canadian Celiac Association J.A Campbell Young Investigator Award. E. Verdu holds a McMaster University Dep. of Medicine Internal Career Research Award and the Canadian Celiac Association J.A Campbell Research Award. J.C. Leroux is a recipient of the NSERC Steacie Fellowship. Dr. L. Tuckova is supported by Grant Agency of the Czech Republic 310/07/0414. N. Rivard is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. **Author contributions:** Conceived and designed the experiments: MP, LT, JCL, EFV. Performed the experiments: MP, GF, HD. Analyzed the data: MP, EFV. Contributed reagents/materials/analysis tools: JCL, EFV, JAM, CSD. Wrote the paper: MP, GF, JCL, NR, EFV. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

## 7 Methods

### 7.1 Effect of P(HEMA-*co*-SS) on wheat gliadin, gluten and barley hordein digestion

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich unless otherwise stated. P(HEMA-*co*-SS) ( $47:53 \pm 2\%$ , 45 kDa and 59 kDa) was synthesized by atom transfer radical polymerization as described elsewhere (34).

Isolation of hordein from barley was performed as previously reported (56). Briefly, barley grains were milled and mixed with 32 mL 70% ethanol for 2 h. After centrifugation (30 min at  $900 \times g$ ) the supernatant was dialyzed against 0.01 M acetic acid and freeze-dried. The lyophilized product was dispersed in 0.01 M acetic acid, centrifuged and the supernatant freeze dried a second time to give the crude hordein.

**Digestion** - Stock solutions of the enzymes were prepared prior to use: i) pepsin (3480 U/mg) in HCl 0.02 M, 6 mg/mL, ii) trypsin (1310 U/mg) in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 6.8, 20 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 mmol/L NaOH), 50 mg/mL, and iii) chymotrypsin (96 U/mg) in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 6.8, 20 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 mmol/L NaOH) 50 mg/mL,  $\alpha$ -Gliadin (supplied by Prof. Popineau, Institut National de Recherche Agronomique, Nantes; 7.5 mg/mL), gluten (15 mg/mL) or hordein (15 mg/mL) were suspended in HCl 0.02 M for 15 min at 37°C in the presence or absence of P(HEMA-*co*-SS) at different gliadin (or gluten)/P(HEMA-*co*-SS) mass ratios. In the calculation of the mass ratios, it was assumed that gluten contained 50% gliadin (57). Pepsin was added to a final concentration of 0.024 mg/mL and incubated for 2 h, at 37°C under stirring. Thereafter, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was added (0.12 M), and the pH adjusted to 6.8 by the addition of NaOH 1 M. The suspension was supplemented with trypsin to a final concentration of 0.375 mg/mL and incubated for 2 h, at 37°C under stirring. Subsequently, chymotrypsin was added to the suspension to a final concentration of 0.375 mg/mL and incubated for 2 h, at 37°C under stirring. After completion of the digestion process, samples were heat-inactivated for 5 min at 95°C, freeze-dried and stored at -20°C until analysis. The freeze-dried  $\alpha$ -gliadin and gluten digests were resuspended in ultrapure water and centrifuged ( $14'000 \times g$ ) for 10 min.

Supernatants were then further diluted 1 in 10 (v/v) with water containing 0.1% formic acid. Each dilution was injected at least in triplicate.

**Analytical method-** All samples were analyzed using an HPLC system composed of a Rheos Allegro quaternary pump (Flux Instruments, Basel, Switzerland), column oven (hot dog 5090), C18-column (Hypersil Gold, 100 x 1 mm, 1.9  $\mu$ m) and XCalibur control software (all obtained from Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA). Samples were injected at a column temperature of 35°C, at a volume of 10  $\mu$ L and a flow rate of 50  $\mu$ L/min using water with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (solvent B). The gradient for wheat gliadin and gluten analysis consisted of 95% solvent A as initial value, 95-50% A in 1-30 min, 50-5% A in 30-35 min, 5% A in 35-40 min, 5-95% A in 40-41 min and 95% A in 41-50 min. The gradient for analysis of hordein samples was modified as follows: 95% solvent A as initial value, 95-50% A in 1-19 min, 50-5% A in 19-23 min, 5% A in 23-27 min, 5-95% A in 27-28 min, and 95% A in 28-31 min. The LC was directly connected to an LTQ XL linear quadrupole Ion Trap (Thermo Fisher Scientific Inc.). Ionization was conducted *via* electrospray ion (ESI) source. Data acquisition was carried out by full MS, followed by MS<sup>2</sup>-fragmentation of the five most intense signals in an automated data dependent scan. Raw data were subjected to the Sequest search algorithm using Proteome Discoverer Software (Thermo Fisher Scientific Inc.). Detected peptides were searched against all sequences from the ExPASy Proteomics database (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland) that match the following search terms: *triticum*, *aestivum*, wheat glutenin and gliadin for gluten and gliadin digests; and hordein, gluten, barley, *hordeum vulgare* for hordein digests. Exclusively identified peptides with a cross-correlation > 1.5 and a peptide probability > 30% were considered and reviewed in literature for T-cell toxicity. Quantitative analysis of peptides of interest was performed using LCquan Software (Thermo Fisher Scientific Inc.). The program integrated areas under the peak of individual peptides. The relative abundance (in %) in all samples was calculated setting the respective non-polymer treated sample to 100%. Calibration curve was performed by spiking gluten digest with increasing amounts of LGQQQPFPPQQPY.

## 7.2 Absorption experiments

All animal experiments were approved by the McMaster University and University of Montreal, Animal Care Committees, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (1 mCi/mg) was prepared by tritium gas exchange chromatography by American Radiolabeled Chemicals (St Louis, MO). The polymer was purified by dialysis against water for 4 days and finally freeze-dried before use.

**Study design-** Male Sprague Dawley rats (250-280 g for single dose study and 410-430 g at gavage dose for chronic dose study) were housed individually in metabolic cages. [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) was administered to 14 rats by gavage. Seven rats received a single dose of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (ca. 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ , ca. 150 mg/kg) and seven rats were treated with unlabeled P(HEMA-*co*-SS) in the drinking water at approximately 100 mg/kg/day for 21 days followed by a single dose of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (ca. 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ , ca. 150 mg/kg) by gavage on day 22. Total urines and feces were collected from 0 to 12, 12 to 24, 24 to 36, 36 to 48 and 48 to 72 h after administration of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS). Aliquots of blood were sampled at 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h by subclavian vein under isoflurane anesthesia. At sacrifice, exsanguination was performed followed by a saline flush before collecting organs (small intestine, colon, liver, kidneys and spleen).

Transgenic male mice (~25 g), 6 to 8 weeks old and expressing HLA-HCD4/DQ8 (HLA-DQA1\*0301; HLA-DQB1\*0302) genes in the absence of endogenous mouse class II genes were used (44). Mice (n=4/group) were orally sensitized by gavaged with gluten (500  $\mu\text{g}$ ) and cholera toxin (CT) (25  $\mu\text{g}$ ) as mucosal adjuvant, once a week during 3 weeks. Controls (n=4/group) received CT alone. The mice were housed individually in metabolic cages and received a single dose of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (ca. 22.4  $\mu\text{Ci/kg}$ , ca. 240 mg/kg) one week after the last sensitization. Urine and feces were collected from 0 to 12, 12 to 24, 24 to 36, 36 to 48 and 48 to 72 h after administration of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS). Aliquots of blood were sampled at 72 h. At sacrifice, exsanguination was performed followed by a saline flush before collecting liver and kidneys.



**Analytical method** - Urines, feces and tissues were weighed and then homogenized. All homogenates were aliquoted (approximately 100-300 mg) and degraded using Solvable<sup>®</sup> (Perkin Elmer, Waltham, MA) at 60°C and then bleached using hydrogen peroxide (30% v/v). Radioactivity was measured in Hionic Fluor<sup>®</sup> (Perkin Elmer) using a Liquid Scintillation Analyser Tri-Carb 2100TR (Packard, Meriden, CT). Radioactivity in blood, urines, feces and tissues was expressed as a percentage of the administered dose. For blood, the percentage of the administered dose was calculated by multiplying the blood radioactivity per gram by  $0.064 \times$  body weight in g for rats or  $0.072 \times$  body weight in g for mice (58).

### 7.3 *In vivo* experiments on transgenic mice

HLA-HCD4/DQ8 male mice (~26 g), 6 to 8 weeks old were used (44). Mice (n=8-10/group) were mucosally sensitized with gluten (500 µg) and CT (25 µg) as mucosal adjuvant, once a week for 3 weeks. One week, after the last sensitization, mice were randomly assigned to one of the study groups and orally challenged once. A positive control group received a mixture composed of 2 mg bovine serum albumin (BSA) and 2 mg wheat starch with 2 mg of gluten dissolved in 0.02 M acetic acid. Treatment group with high dose (HD) of P(HEMA-co-SS) consisted of gluten-sensitized mice gavaged with gluten/BSA/starch mixture and P(HEMA-co-SS) (4 mg) (gluten polymer 1:2 w/w). Treatment group with low polymer dose (LD) received 1 mg of polymer (gluten/polymer 2:1 w/w). In another series of experiments the polymer dose was kept at 4 mg but the gluten amount increased to 4 mg (higher level of gluten, HL, gluten/polymer 1:1 w/w). Negative control group composed of non-sensitized mice (CT only) gavaged with BSA/starch mixture, but no gluten. P(HEMA-co-SS) was administered 5 min prior to the mixture gavage. Mice were sacrificed 24 h after the last gavage. Besides, in order to verify the impact of sensitization on intestinal permeability an additional negative control group composed of mucosally sensitized mice (CT + gluten once a week for 3 weeks) gavaged with BSA/starch mixture was performed. This control group showed identical <sup>51</sup>Cr-EDTA permeability data and a trend toward higher mucosal conductance levels (Fig. S3-8).

### **7.3.1 Effect of P(HEMA-*co*-SS) on intestinal permeability in gluten-sensitized mice**

Two sections of the jejunum from each mouse were used for epithelial conductance and intestinal paracellular permeability measurements and the experiments were performed as described elsewhere (43). Sections of tissues (jejunum) (5 cm) were removed and divided into two segments. Each segment was opened along the mesenteric border, rinsed and mounted in an Ussing chamber (exposed surface area 0.6 cm<sup>2</sup>). Tissues were bathed in oxygenated Krebs buffer containing 10 mM glucose (serosal side) or 10 mM mannitol (luminal side) at 37°C. The net active transport across the epithelium was measured *via* a short circuit current (I<sub>sc</sub>) injected through the tissue under voltage clamp conditions. After a 15-min equilibration period, conductance (mS/cm<sup>2</sup>) was recorded. <sup>51</sup>Cr-EDTA (Perkin Elmer, Waltham, MA) was used as a model to probe paracellular permeability. <sup>51</sup>Cr-EDTA (6 µCi/mL) was added to the luminal buffer once equilibrium was reached. Serosal samples (500 µL) were taken at 30-min intervals for 2 h and replaced with fresh buffer to maintain constant volume. The <sup>51</sup>Cr-EDTA was measured by scintillation counter (Beckman Coulter LS6500 Multi Purpose Scintillation Counter, Beckman, CA).

### **7.3.2 Effect of P(HEMA-*co*-SS) on anti-gliadin antibodies in gluten sensitized-mice**

The small intestine was removed; the content flushed using 6 mL of phosphate buffered saline (PBS) containing 0.05 mM EDTA and 0.1 mg/mL soybean trypsin inhibitor into a tube containing 40 µL of 100 mM phenylmethylsulfonylfluoride in 95% *v/v* ethanol. After mixing, samples were centrifuged at 2000 *x g* at 4°C for 30 min, the supernatants collected and stored at -20°C. All samples were processed within 1 week. Anti-mouse gliadin-IgA was determined in intestinal contents by ELISA. 96-well ELISA plates (Nunc-Immuno Plates Maxisorp, Roskilde, Denmark) were coated with 50 µL of PBS including 5 µg of gliadin dissolved with 70% ethanol. 50 µL of intestinal wash supernatants were added in triplicate to the wells. Goat anti-mouse IgA–horseradish peroxidase (HRP) conjugate (α-chain specific) was then added as secondary antibodies (50 µL per well). Color was developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (Cedarlane Lab, ON),

reaction stopped by HCl 1 N and optical densities (OD) were read at 450 nm using an ELISA plate reader (Bio-TEK Instruments Inc., Winooski, VT). The IgA OD were normalized by total protein concentration (Bio-Rad, Bradford protein assay reagent) per sample.

### **7.3.3 Effect of P(HEMA-*co*-SS) on splenocyte proliferation in gluten sensitized-mice**

Splenocytes were isolated as reported elsewhere (42). A peptic tryptic digest of gliadin (PT-gliadin) was prepared as described previously (42). Protein concentrations were measured with bicinchoninic acid assay. Splenocytes were cultured in RPMI 10% FBS supplemented with either Con A, PT-gliadin (500 µg/mL) or medium alone and incubated 72 h, 37°C, in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The cells were pulsed with 1 µCi/well [<sup>3</sup>H]–thymidine for additional 18 h. Cells were harvested on an automatic cell harvester and [<sup>3</sup>H]–thymidine uptake was measured by counting the radioactivity on filters with Beckman scintillation beta-counter. Results were expressed as stimulation index (SI) (mean cpm of triplicate culture containing Ag)/(mean of cpm of triplicate cells cultured with medium alone). The amounts of IL-10, MCP-1 and TNF-α in supernatants of cultured splenocytes were determined by ELISA using CBA kit (BD Bioscience ON) according to manufacturer's instructions.

## **7.4 Effect of P(HEMA-*co*-SS) in biopsies from CD patients**

Patients were recruited after local Ethic's Committee approval. Patients with untreated CD (as diagnosed by serology) attending gastrointestinal endoscopy clinics at various hospitals within the city of Prague were invited to participate in the study. Written informed consent was obtained from all patients. Small intestinal biopsies with confirmed Marsh III lesions were used for cytokine responses to gliadin. In the first set of experiments (5 min pre-incubation of gliadin with P(HEMA-*co*-SS) at 37°C prior to digestion), patients (n=4), age range 29-49 year-old, mean 37, F/M 3/1 were included. In the second set of experiments (pre-incubation of P-gliadin with P(HEMA-*co*-SS)), patients (n=5), age range 33-49 year-old, mean 38, F/M 4/1 were included. Four biopsies (of similar size, 2-3 mm)

were obtained from each patient and incubated under 4 different conditions consisting of medium alone, gliadin, P(HEMA-*co*-SS), and gliadin + P(HEMA-*co*-SS). Endoscopic biopsies obtained from patients with confirmed CD were cultivated in RPMI 1640 (BioWhittaker, Lonza, Belgium), supplemented with L-glutamine (2 mM), penicillin/streptomycin (100 UI penicillin/mL, 100 µg streptomycin/mL), 10% FBS and 0.001% protease inhibitor cocktail (Cytoskeleton, Denver, CO) and stimulated for 24 h with 100 µg of P-gliadin and/or 300 µg of P(HEMA-*co*-SS) or P-(gliadin/P(HEMA-*co*-SS)). When applied together, P-gliadin and P(HEMA-*co*-SS) were pre-incubated for 30 min in 37° C, 5% CO<sub>2</sub> and then added to the biopsies. The supernatants were collected and stored in -20° C until use. The levels of IL-10 and TNF-α were determined by ELISA (DY210 and DY217, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. The P-gliadin digestion was performed as previously reported (59). Beaded pepsin-agarose gel was tested for lipopolysaccharide contamination and shown to be below the limit of detection of the assay. The gliadin/P(HEMA-*co*-SS) or P-gliadin/P(HEMA-*co*-SS) ratios were set at 1:3 (*w/w*).

## 7.5 Statistical analysis

Group values for *in vitro* and animal experiments were compared using a parametric analysis of variance (ANOVA) test, followed by Tukey or Tukey-Kramer test to determine the significance of all paired combinations (normality was assumed on all experimental data sets). Group values for the biopsies studies were compared using a Kruskal-Wallis, followed by a Nemenyi test to determine the significance of the combinations.

## 8 References

1. Tye-Din, J.A., et al. 2010. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med* **2**:41ra51.
2. Bhattacharya, M., et al. 2009. Prevalence of Celiac disease in north Indian children. *Indian Pediatr* **46**:415-417.
3. Fasano, A., et al. 2003. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* **163**:286-292.
4. Johannsson, G.F., et al. 2009. The prevalence of celiac disease in blood donors in Iceland. *Dig Dis Sci* **54**:348-350.
5. Maki, M., et al. 2003. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* **348**:2517-2524.
6. West, J., et al. 2003. Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut* **52**:960-965.
7. Maiuri, L., et al. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* **362**:30-37.
8. Garner, C.P., et al. 2009. Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in US population. *Hum Mol Gen* **18**:4219-4225.
9. Dubois, P.C.A., et al. 2010. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* **42**:295-302.
10. Green, P.H., et al. 2006. Celiac disease. *Annu Rev Med* **57**:207-221.
11. Fasano, A., et al. 2005. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **19**:467-478.
12. Verdu, E.F., et al. 2009. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol* **104**:1587-1594.
13. Ludvigsson, J.F., et al. 2009. Small-intestinal histopathology and mortality risk in celiac disease. *JAMA* **302**:1171-1178.
14. Green, P.H.R. 2009. Mortality in celiac disease, intestinal inflammation, and gluten sensitivity. *JAMA* **302**:1225-1226.
15. Lee, A.R., et al. 2007. Economic burden of a gluten-free diet. *J Hum Nutr Diet* **20**:423-430.
16. Stevens, L., et al. 2008. Gluten-free and regular foods: a cost comparison. *Can J Diet Pract Res* **69**:147-150.
17. Niewinski, M.M. 2008. Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc* **108**:661-672.
18. Pinier, M., et al. 2010. Prevention measures and exploratory pharmacological treatments of celiac disease. *Am J Gastroenterol* **105**:2551-2561.
19. Gianfrani, C., et al. 2007. Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology* **133**:780-789.
20. Van den Broeck, H.C., et al. 2009. Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biol* **9**:41.

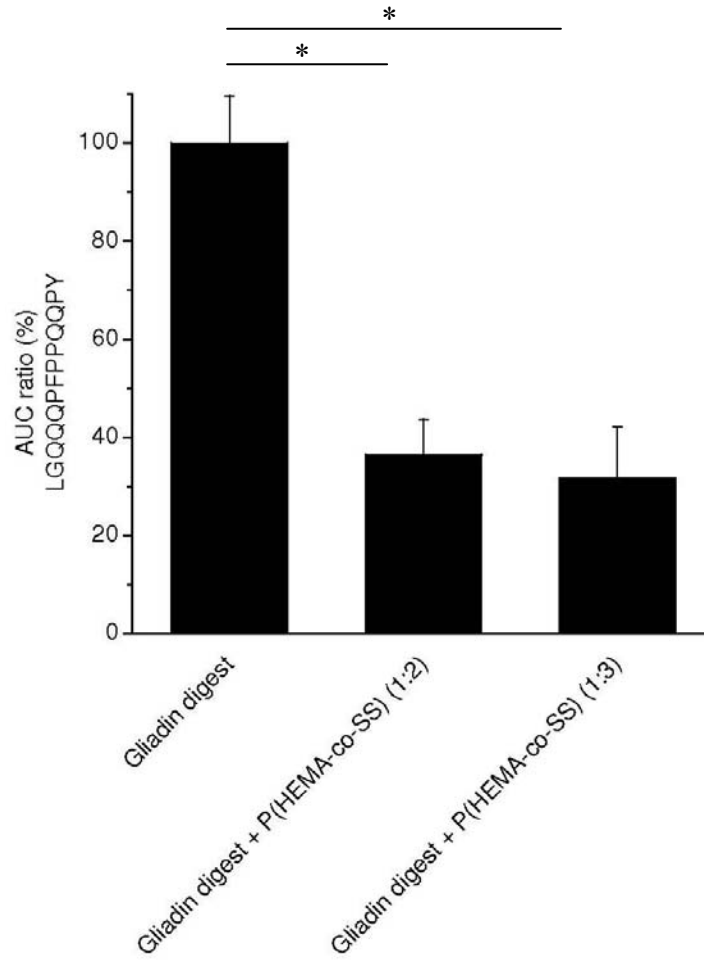
21. De Angelis, M., et al. 2006. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. *Biochim Biophys Acta* **1762**:80-93.
22. Di Cagno, R., et al. 2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* **70**:1088-1096.
23. Gass, J., et al. 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology* **133**:472-480.
24. Stepniak, D., et al. 2006. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* **291**:G.621-629.
25. Tye-Din, J.A., et al. 2010. The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin Immunol* **134**:289-295.
26. Paterson, B.M., et al. 2007. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* **26**:757-766.
27. Kelly, C.P., et al. 2009. Safety, tolerability and effects on intestinal permeability of larazotide acetate in celiac disease: results of a phase IIB 6-week gluten-challenge clinical trial. *Gastroenterology* **136**:A-474.
28. Huibregtse, I.L., et al. 2009. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of Lactococcus lactis delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Ab<sup>o</sup> Dq8 transgenic mice. *J Immunol* **183**:2390-2396.
29. Schuppan, D., et al. 2009. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* **137**:1912-1933.
30. Pardin, C., et al. 2008. Reversible and competitive cinnamoyl triazole inhibitors of tissue transglutaminase. *Chem Biol Drug Des* **72**:189-196.
31. Ozaki, S., et al. 2010. Potent transglutaminase inhibitors, aryl [beta]-aminoethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett* **20**:1141-1144.
32. Siegel, M., et al. 2007. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. *Bioorg Med Chem* **15**:6253-6261.
33. Dhal, P.K., et al. 2009. Functional polymers as therapeutic agents: concept to market place. *Adv Drug Deliv Rev* **61**:1121-1130.
34. Pinier, M., et al. 2009. Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology* **136**:288-298.
35. Vader, W., et al. 2002. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* **122**:1729-1737.
36. Henderson, K.N., et al. 2007. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* **27**:23-34.
37. Molberg, O., et al. 2003. Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* **125**:337-344.
38. Vader, L.W., et al. 2003. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* **125**:1105-1113.

39. Arentz-Hansen, H., et al. 2000. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* **191**:603-612.
40. Shan, L., et al. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **297**:2275-2279.
41. Shan, L., et al. 2005. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res* **4**:1732-1741.
42. Natividad, J.M., et al. 2009. Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice. *PLoS One* **4**:e6472.
43. Verdu, E.F., et al. 2008. Gliadin-dependent neuromuscular and epithelial secretory responses in gluten-sensitive HLA-DQ8 transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G217-225.
44. Black, K.E., et al. 2002. HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *J Immunol* **169**:5595-5600.
45. Lammers, K.M., et al. 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* **135**:194-204.
46. Fasano, A. 2008. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *Am J Pathol* **173**:1243-1252.
47. Matysiak-Budnik, T., et al. 2008. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* **205**:143-154.
48. Molberg, O., et al. 2001. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* **31**:1317-1323.
49. Freitag, T.L., et al. 2009. Gliadin-primed CD4<sup>+</sup>CD45RBlowCD25<sup>-</sup> T cells drive gluten-dependent small intestinal damage after adoptive transfer into lymphopenic mice. *Gut* **58**:1597-1605.
50. Menard, S., et al. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Muc Immunol* **3**:247-259.
51. Zhou, Y.F., et al. 2010. Oral tolerance to food-induced systemic anaphylaxis mediated by the C-type lectin SIGNR1. *Nat Med* **16**:1128-1134.
52. Salvati, V.M., et al. 2005. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* **54**:46-53.
53. Plone, M.A., et al. 2002. Sevelamer, a phosphate-binding polymer, is a non-absorbed compound. *Clin Pharmacokinet* **41**:517-523.
54. Liang, L., et al. 2009. Interaction of alpha-gliadin with poly(HEMA-co-SS): structural characterization and biological implication. *Biopolymers* **91**:169-178.
55. Arrieta, M.C., et al. 2006. Alterations in intestinal permeability. *Gut* **55**:1512-1520.
56. Ewart, J.A.D. 1980. Isolation of a hordein of low electrophoretic mobility. *J Sci Food Agr* **31**:82-85.

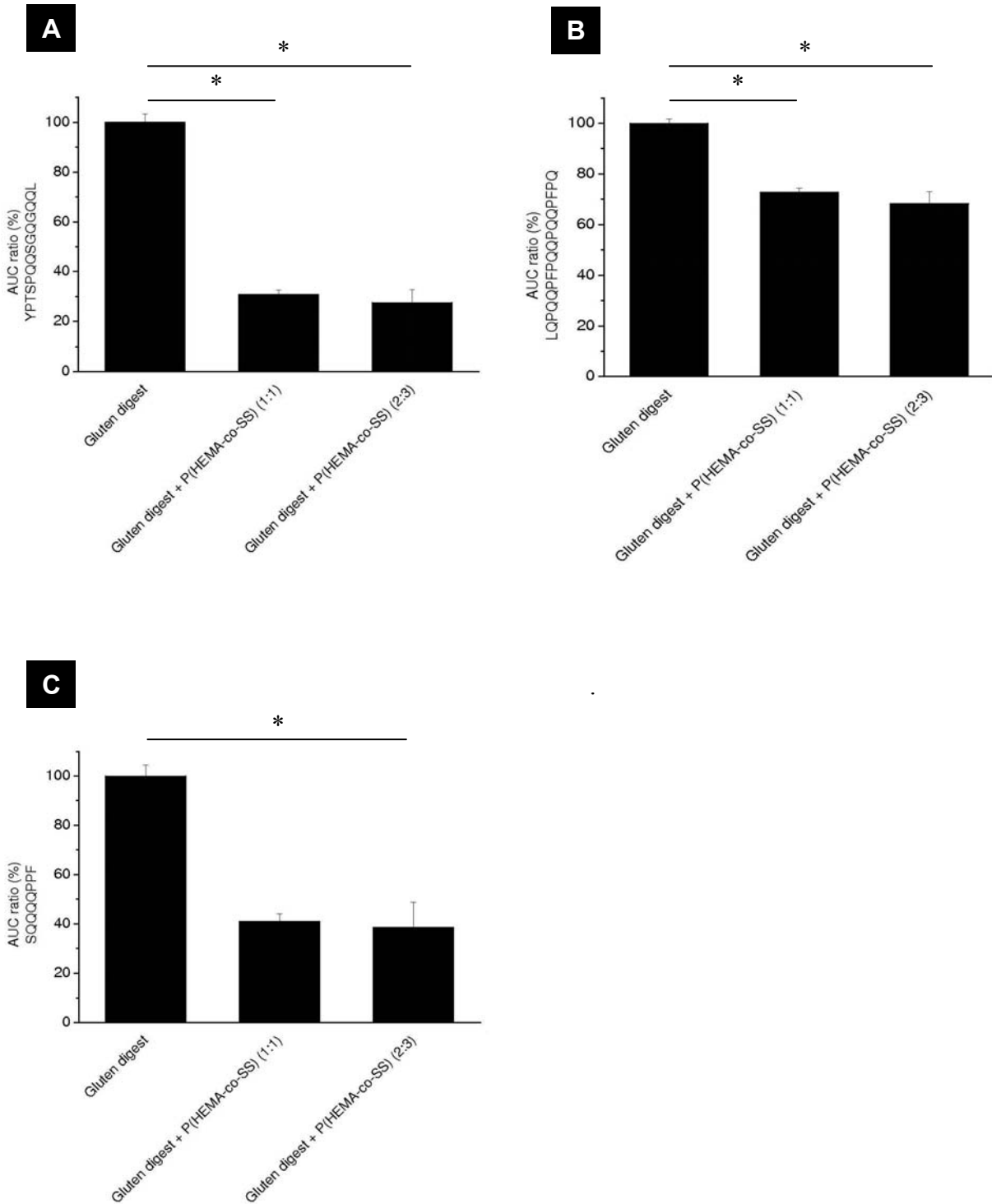
57. van den Broeck, H.C., et al. 2009. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. *J Chromatog B: Anal Tech Biomed Life Sci* **877**:975-982.
58. Diehl, K.H., et al. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* **21**:15-23.
59. Cinova, J., et al. 2007. Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol* **27**:201-209.



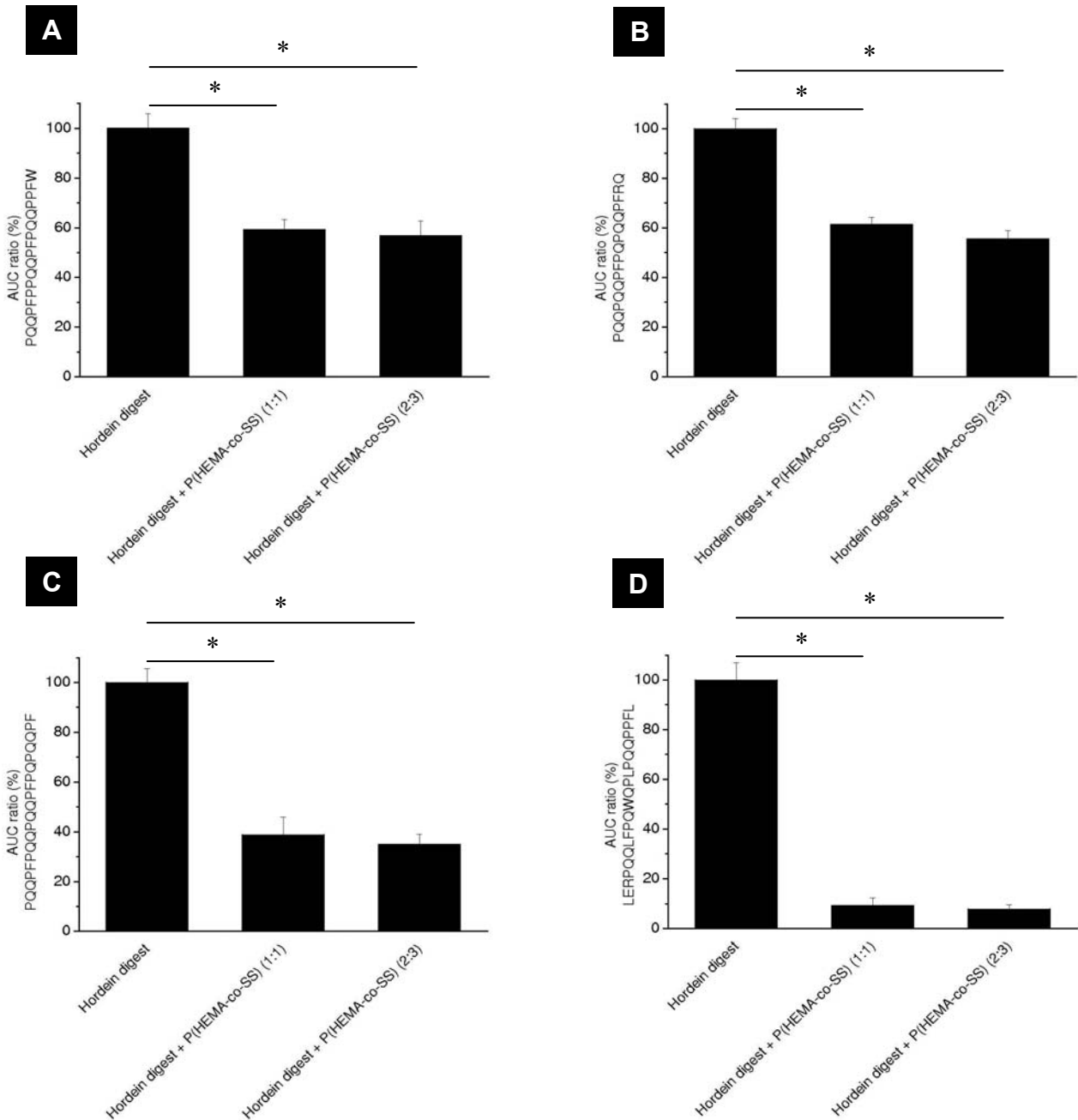
## 9 Supplementary information



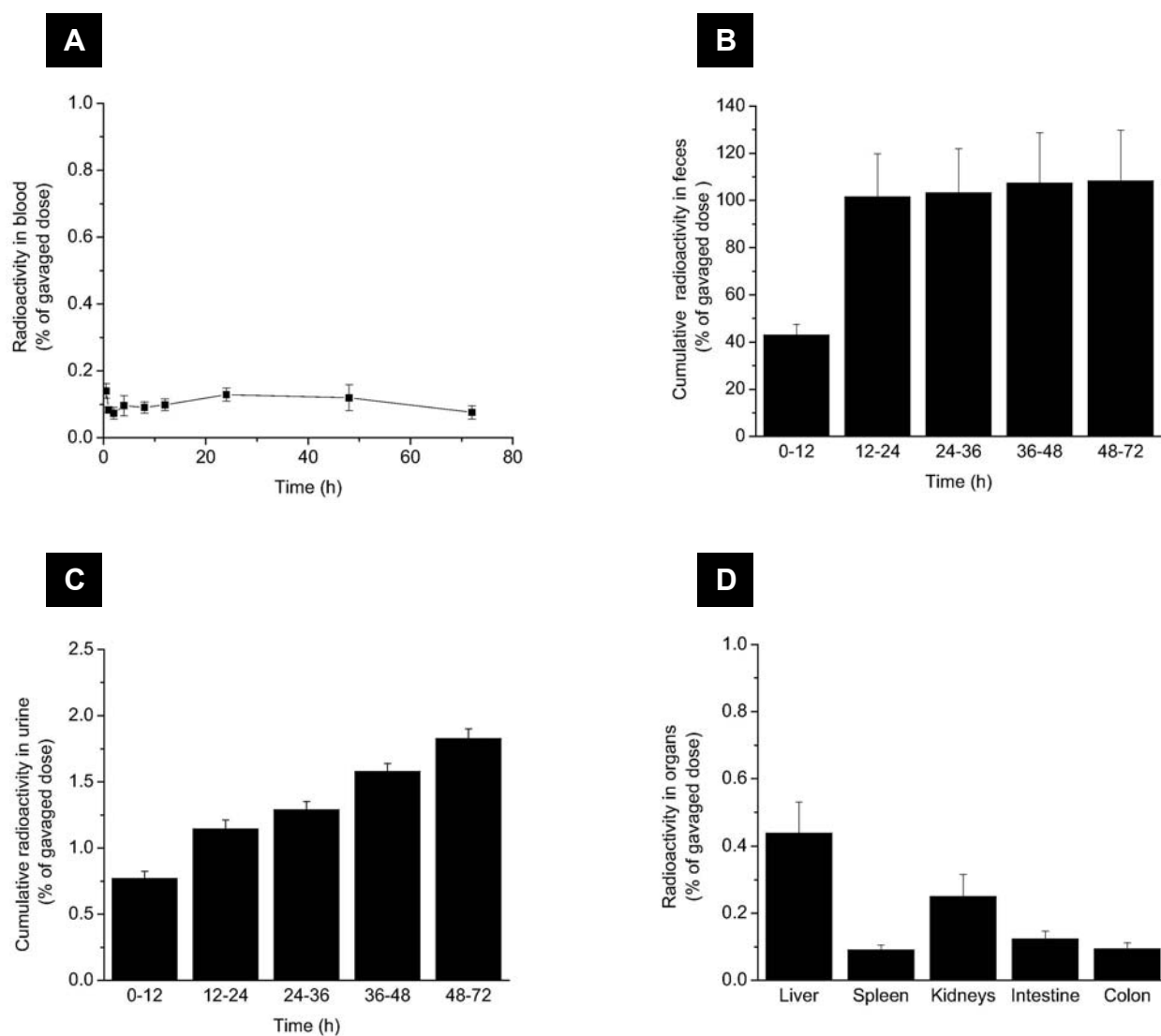
Supplementary Figure 3-1. P(HEMA-*co*-SS) decreases the formation of the 13-mer peptide, LGQQQPFPPQQPY from wheat gliadin. Digested gliadin samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gliadin digest in the absence of P(HEMA-*co*-SS) (positive control). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.001$ .



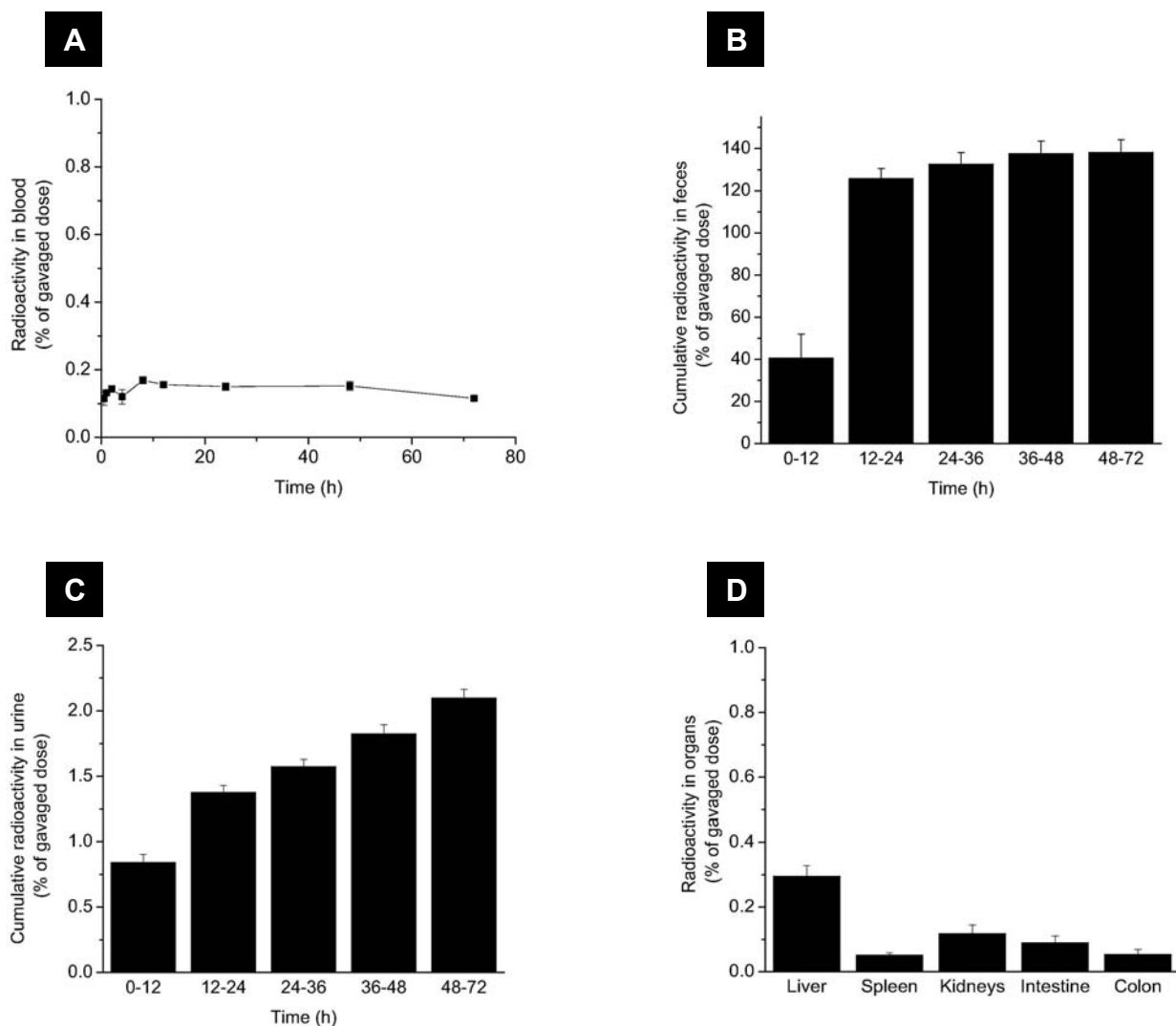
Supplementary Figure 3-2. P(HEMA-co-SS) decreases the formation of peptides YPTSPQSGGQQL (**A**), LQPQQPFQPPQPPQ (**B**) and SQQQQPPF (**C**) from wheat gluten. Digested gluten samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the gluten digest in the absence of P(HEMA-co-SS). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.001$ .



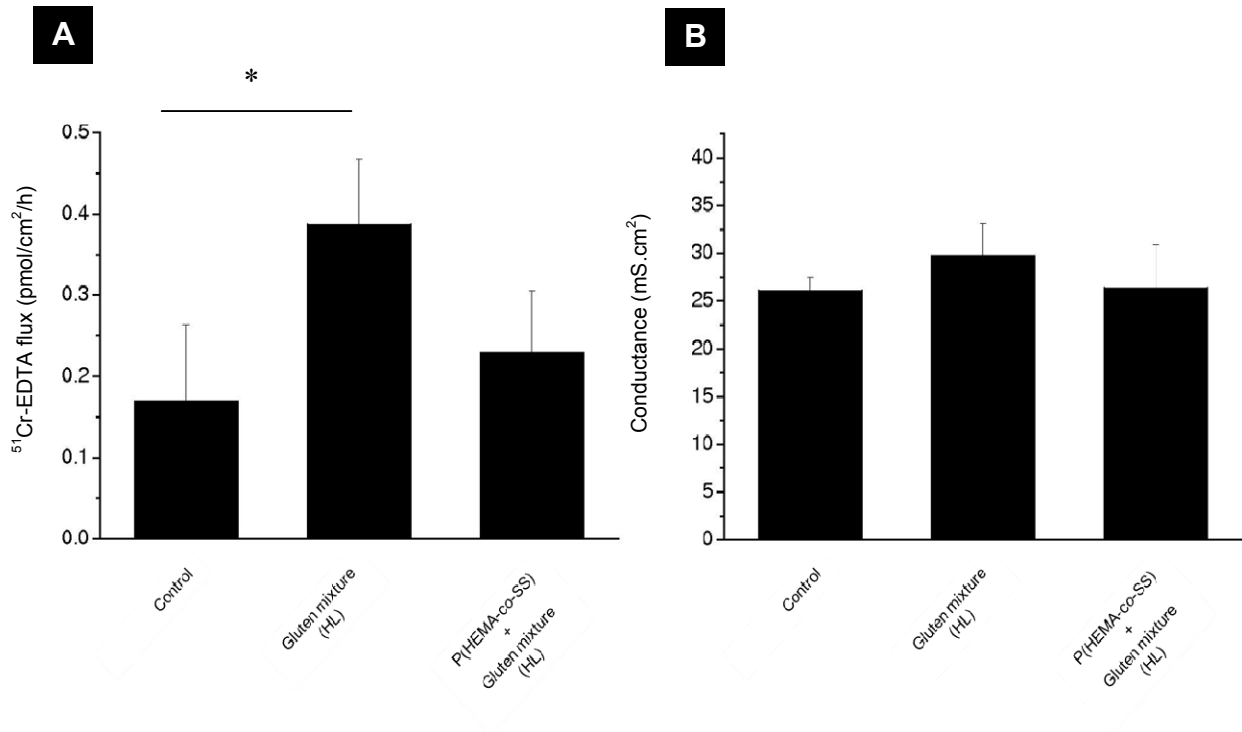
Supplementary Figure 3-3. P(HEMA-co-SS) decreases the formation of peptides PQQFPFPQQPFPQQPPFW (A), PQQPQQPFPQPQQPFRQ (B), PQQFPQQPQQPFPQPQQPF (C), and LERPQQLFPQWQPLPQQPPFL (D) from barley hordein. Digested hordein samples were analyzed by LC-MS. Relative abundance was determined by comparison with the hordein digest in the absence of P(HEMA-co-SS) (positive control). Mean  $\pm$  SEM displayed from 3 injections of 3 independent samples, \* $p \leq 0.005$ .



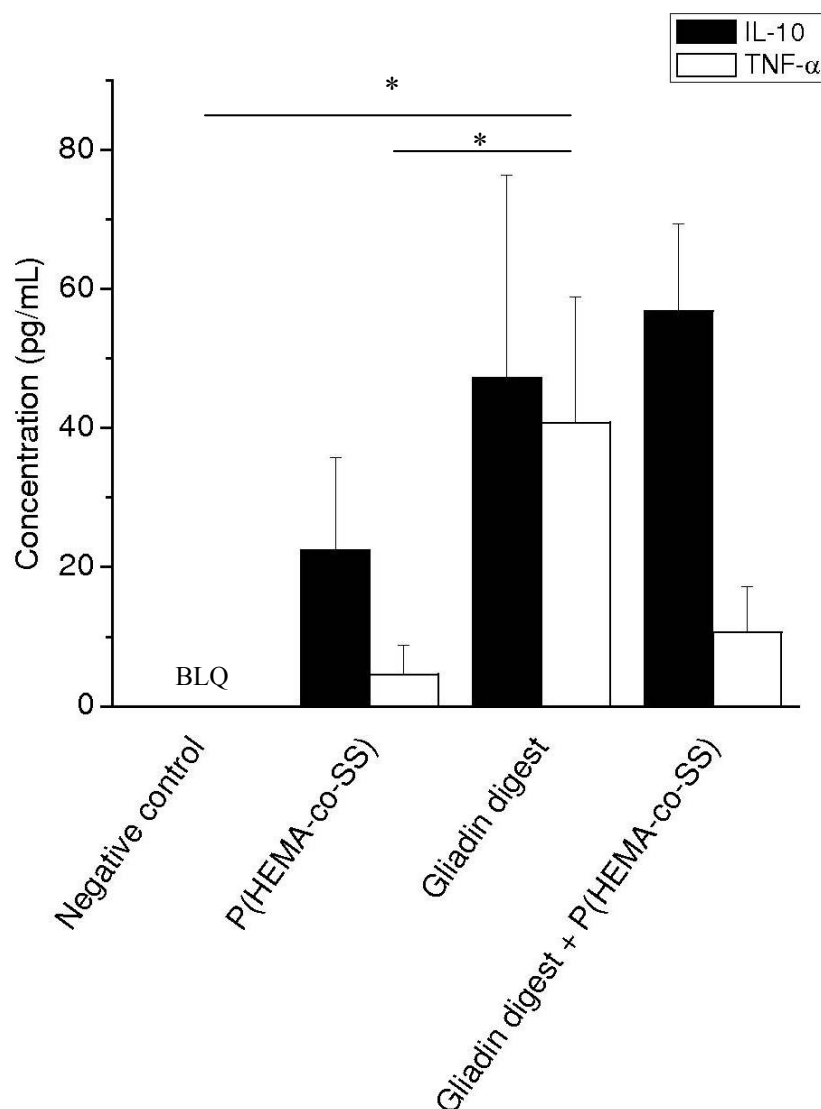
Supplementary Figure 3-4. P(HEMA-*co*-SS) is and mainly excreted in feces and poorly absorbed. Pharmacokinetics, excretion profiles and biodistribution of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) in Sprague Dawley rats after single oral dosing (150 mg/kg, 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ ). (A) Blood concentrations, (B) cumulative dose excreted in the feces, (C) cumulative dose excreted in urine, (D) organ distribution. Mean  $\pm$  SEM (n=7).



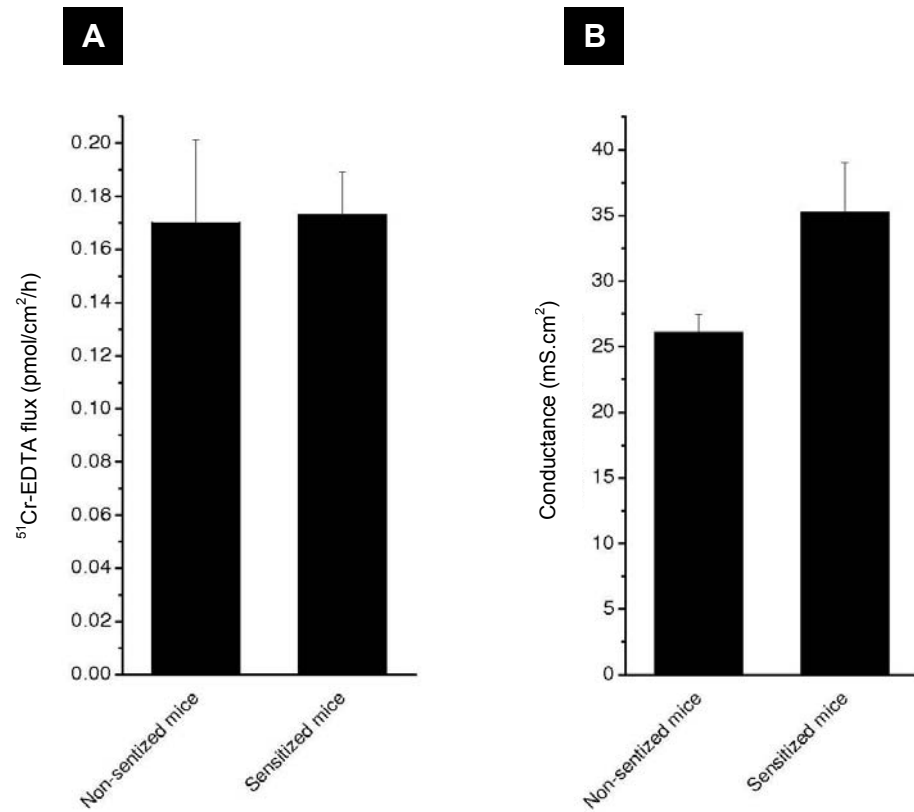
Supplementary Figure 3-5. P(HEMA-*co*-SS) is and mainly excreted in feces and poorly absorbed. Pharmacokinetics, excretion profiles and biodistribution of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) in Sprague Dawley rats, after a polymer exposure for 21 days (100 mg/kg/day) and a single dose of [ $^3\text{H}$ ]-P(HEMA-*co*-SS) (150 mg/kg, 6.4  $\mu\text{Ci/kg}$ ) at day 22. (A) Blood concentrations, (B) cumulative dose excreted in the feces, (C) cumulative dose excreted in urine, (D) organ distribution. Mean  $\pm$  SEM (n=7).



Supplementary Figure 3-6. (A)  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability), (B) intestinal tissue conductance. Controls: non-sensitized mice gavaged with BSA and starch (n=8-10); gluten mixture (HL) (gluten mixture with a higher level of gluten, 4 mg) group: gluten-sensitized mice gavaged with wheat gluten (4 mg)/BSA (2 mg)/starch (2 mg) (n=5); P(HEMA-co-SS) + gluten mixture (HL) group (treatment group): gluten-sensitized mice gavaged first with P(HEMA-co-SS) (4 mg) and subsequently with wheat gluten (4 mg)/BSA (2 mg)/starch (2 mg) (gluten/polymer 1:1 w/w) (n=5). Mean  $\pm$  SEM \*p  $\leq$  0.05.



Supplementary Figure 3-7. Production of TNF- $\alpha$  (white bars) and IL-10 (black bars) in culture supernatants from biopsies of CD patients after incubation with P(HEMA-co-SS) alone or with P-gliadin +/- P(HEMA-co-SS). Negative control corresponds to biopsies incubated with medium only. Mean  $\pm$  SEM (n=5), \*p  $\leq$  0.05. BLQ: below limit of quantification (< 31.25 pg/mL for IL-10 and < 15.62 pg/mL for TNF- $\alpha$ ).



Supplementary Figure 3-8. (A)  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA flux (paracellular permeability) and (B) intestinal tissue conductance in non-sensitized (n=8-10) vs. gliadin sensitized (n=5) HCD4/DQ8 mice. Mean  $\pm$  SEM.



## Chapitre 4. Discussion

### 1 Synthèse

L'objectif général de cette thèse était d'évaluer un nouveau traitement d'appoint pour la maladie cœliaque. Plus particulièrement, les travaux visaient à mettre au point, à caractériser et à évaluer un polymère neutralisant la gliadine. Dans cette optique, différents polymères de composition et de structure variées ont été testés. Ces travaux ont permis de retenir un copolymère statistique linéaire, composé de sulfonate de styrène (SS) et d'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA).

La synthèse des polymères linéaires (P(HEMA-*co*-SS) et PSS)) a été réalisée par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (Atom Transfert Radical Polymerization : ATRP) à partir d'un amorceur bifonctionnel. Ce macro-amorceur, le poly(éthylène glycol) (PEG)-dibromé a été préparé, purifié et caractérisé, avant la synthèse des polymères proprement dite.

Dans un premier temps, un PEG de 2 000 Da et 44 unités de répétition d'oxyde d'éthylène a été fonctionnalisé à ses deux extrémités hydroxyles (OH) par du bromure 2-bromoisobutyryle, en présence de triéthylamine (TEA), en milieu organique (tétrahydrofurane, THF) (Ranger *et al.* 2001). La purification a été effectuée par précipitation et filtration successives (voir annexe 1). Dans un second temps, les polymères avec des compositions variables en HEMA et SS ont été synthétisés à partir de cet amorceur fonctionnalisé, le di(2-bromo-2-méthylpropionate)PEG, par ATRP en milieu méthanol/eau (voir annexe 2).

Initialement, les monomères ont été choisis pour obtenir un polymère hydrosoluble et biocompatible et permettre divers types d'interactions (exposés plus en détail dans la section 4.2 : « effet de la composition sur la complexation »). Au début du projet, un polystyrène sulfonate (tolevamer) était déjà en étude clinique pour la séquestration de la toxine de *Clostridium difficile* (Ryder 2010) et le P(HEMA) était déjà étudié depuis les

années 60 pour des applications biologiques (Wichterle *et al.* 1960) du fait de son hydrophilie et de sa biocompatibilité (Liu *et al.* 2009).

Cette polymérisation contrôlée a permis d'obtenir des composés monodisperses ainsi qu'en témoignent les faibles valeurs des indices de polymolécularité ( $I_p = M_w/M_n$ ) (Tableau 4-1). Ces faibles valeurs sont en accord avec la littérature qui rapporte que l'ATRP permet une croissance homogène des chaînes de polymères ( $1,1 < I_p < 1,5$  (Matyjaszewski *et al.* 2001)). En outre, cette voie de polymérisation est réalisable dans une grande variété de solvants, notamment, en milieu aqueux. Ce point est un avantage non négligeable pour une production industrielle, car c'est un solvant peu coûteux et sécuritaire. L'ajout de méthanol dans le milieu réactionnel permet de réduire la réactivité des monomères de HEMA et de dérivés de styrène, et ainsi améliorer le contrôle de la polymérisation. Nos résultats concordent avec la littérature rapportant des  $I_p$  de 1,1 à 1,3 pour des polymérisations de HEMA et de styrène sulfonate en présence de méthanol (Robinson *et al.* 2001 ; Iddon *et al.* 2004; Tsarevsky *et al.* 2004).

L'amorceur, le di(2-bromo-2-méthylpropionate)PEG appartient à une famille d'amorceurs classiques de l'ATRP. Les dérivés de type « bromo-propionates » sont des amorceurs de choix pour la polymérisation de méthacrylates (Matyjaszewski *et al.* 2001). Il est vrai qu'un oligoéthylène glycol aurait pu être choisi à la place du PEG ( $M_w$  420 Da) (Wang *et al.* 2000; Robinson *et al.* 2001). Le choix d'un PEG avait été fait en raison de la facilité de purification par précipitation (Ranger *et al.* 2001). Cependant, il est envisageable d'utiliser d'autres amorceurs commerciaux comme le méthyl- $\alpha$ -bromobutyrate.

Les conditions d'utilisation du complexe métallique  $CuBr(I)/2,2'$ bipyridine ( *i.e.* 2:1 *mol/mol*, dans l'eau, entre 20 et 30°C) ont déjà été décrites pour l'ATRP (Matyjaszewski *et al.* 2001; Tsarevsky *et al.* 2007). En vue d'une application thérapeutique, il est important de considérer la toxicité des réactifs utilisés. Il est vrai que le cuivre est considéré comme un composé toxique. Il est donc impératif de l'éliminer du produit fini. La purification sur une colonne de silice est une méthode relativement efficace (Tsarevsky *et al.* 2007). Cependant, un dosage du cuivre résiduel doit être envisagé pour s'affranchir de toute toxicité liée à l'usage de ce complexe catalytique.

Outre le complexe catalytique, le point limitant d'une exploitation industrielle est le rendement modéré de la synthèse (en moyenne 20%). Il serait intéressant d'optimiser les conditions opératoires (synthèse et purification) pour minimiser les coûts de production. Malgré tout, l'ATRP reste une méthode de polymérisation facile à amplifier, nécessitant une installation expérimentale de base, car il s'agit d'un procédé en une seule étape à partir de produits de départ peu onéreux.

Tableau 4-1. Récapitulatif de quelques P(HEMA-*co*-SS) utilisés.

Numéro de lot	Masse molaire, $M_n$ (kDa) par RMN $^1\text{H}$	HEMA (mol%) par RMN $^1\text{H}$	SS (mol%) par RMN $^1\text{H}$	Masse molaire, $M_w$ par CES (kDa) [Ip]
<b>MP290208</b>	45	47	53	85 [1,11]*
<b>MP070208</b>	45	42	58	68 [1,12]*
<b>MP300507</b>	43	47	53	62 [1,11]*
<b>MP130109</b>	59	54	46	70 [1,25]**

CES : chromatographie par exclusion stérique. \* en milieu DMF tel que décrit dans le chapitre 2. \*\* en milieu acétonitrile/ tampon acétate (20:80 v/v).

## 2 Effet de la composition sur la complexation

Afin de comprendre les effets de la composition du polymère sur les propriétés de complexation de la gliadine, nous avons établi une petite bibliothèque de P(HEMA-*co*-SS) de masse molaire comparable. Le tableau 4-2 regroupe les polymères utilisés lors des études visant à mesurer l'effet de la composition sur la capture de la gliadine. La composition s'est avérée être un paramètre important pour obtenir une séquestration efficace de la gliadine.

Tableau 4-2. Tableau récapitulatif des polymères utilisés pour l'étude de la composition sur l'efficacité de complexation de l' $\alpha$ -gliadine (Liang *et al.* 2009; Pinier *et al.* 2009; Liang *et al.* 2010).

Numéro de lot	Masse molaire (kDa) Mn	HEMA (mol%) par RMN $^1\text{H}$	SS (mol%) par RMN $^1\text{H}$	Contenu élémentaire théorique			Analyse élémentaire expérimentale		
				%C	%H	%S	%C	%H	%S
<b>MP190506-2</b>	53	81	9	52,34	6,26	5,35	50,13	6,65	4,58
<b>MP190506-3</b>	65	73	27	54,04	7,11	2,31	53,06	7,76	1,19
<b>MP100506-1</b>	57	0	100	46,62	3,44	15,49	42,55	4,13	12,21
<b>MP100506-2</b>	52	45	55	N.D					
<b>MP100806</b>	48	40	60	N.D					

N.D: non déterminé

La complexation de l' $\alpha$ -gliadine a été effectuée de manière similaire à la procédure décrite au chapitre 2 (voir annexe 3).

L'étude comparative a montré qu'à masse molaire comparable (environ 50 kDa), la composition modifiait l'efficacité de séquestration du polymère (Figure 4-1) au ratio massique  $\alpha$ -gliadine/polymère 1:2. Ce phénomène est très marqué à pH intestinal (6,8). A pH gastrique (1,2), la complexation est moins affectée par la composition. Les monomères retenus pour la synthèse du composé séquestrant permettent d'envisager diverses interactions.

Outre la biocompatibilité, comme nous l'avons vu au chapitre 2 (Figure 2-2), les unités HEMA permettent d'envisager des liaisons hydrogène (Liang *et al.* 2009) *via* les acides aminés acides de la gliadine (5 acides glutamiques et un acide aspartique (Shan *et al.* 2002), dont les  $\text{pK}_a$  sont respectivement de 4,25 et 3,65 (Eichhorn 1970)). De plus, la gliadine présente une abondance en groupements glutamine (30%) (Bernardin *et al.* 1967) permettant aussi des liaisons hydrogène. Cependant, la séquestration de la protéine par des liaisons hydrogène n'est probablement pas le mécanisme majeur puisque le P(HEMA-co-

SS) contenant 91 % molaire de HEMA a montré une faible capacité à complexer la protéine (18% à pH 6,8).

Les styrènes sulfonates, quant à eux, permettent de supposer d'une part des interactions hydrophobes grâce au squelette styrène et d'autre part, des interactions électrostatiques grâce aux groupements sulfonate (Liang *et al.* 2009). La densité de charges est connue pour être cruciale dans les interactions avec des protéines (Cooper *et al.* 2006). En milieu acide, la complexation est forte, indépendamment de la composition du séquestrant. Pour les polymères contenant 9 et 100 % molaire de SS, la complexation varie de 80 à 98 %. À ce pH, la protéine comporte plusieurs charges positives grâce aux acides aminés basiques (une lysine, 4 histidines, 4 arginines, dont les  $pK_a$  sont respectivement 10,53, 6,00 et 12,48 (Eichhorn 1970). En revanche à pH 6,8, l' $\alpha$ -gliadine est globalement neutre et hydrophobe ( $\zeta = -1,8$  mV) (Liang *et al.* 2010) car le point isoélectrique de l' $\alpha$ -gliadine se situe aux alentours de 6. Une nette amélioration de la séquestration a été observée à partir de 50-55 % molaire de SS. Le pourcentage de complexation de l' $\alpha$ -gliadine passe de 18 à 67 % pour un copolymère contenant respectivement 9 et 55 % molaire de SS. Il subsiste des interactions électrostatiques entre l' $\alpha$ -gliadine et le polymère à pH 6,8. Cependant ces interactions sont moins abondantes qu'à pH acide. De part la nature hydrophobe de la protéine à pH 6,8, des interactions de nature hydrophobes sont plus probablement envisageables (Liang *et al.* 2009).

La copolymérisation de monomères HEMA avec des quantités croissantes de SS a permis d'augmenter la diversité des interactions (*i.e.* hydrophobes et électrostatiques) (Liang *et al.* 2010) et d'observer la formation de complexes  $\alpha$ -gliadine/P(HEMA-*co*-SS). Au-delà de 50 mol% de SS, la complexation à pH 6,8 semble atteindre un plateau ( $\sim 80$  %). Le PSS et le P(HEMA-*co*-SS) contenant environ 50 % molaire de SS permettent tous deux une complexation efficace de l' $\alpha$ -gliadine et ce quel que soit le pH.

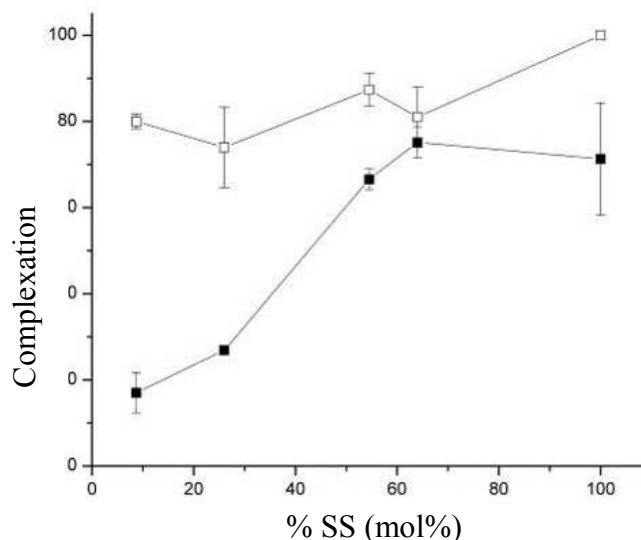


Figure 4-1. (Rappel de la figure supplémentaire 2-1, chapitre 2) Effet du contenu en SS sur la complexation de P(HEMA-*co*-SS) à l' $\alpha$ -gliadine à pH 6,8 (■) et pH 1,2 (□). Le ratio massique  $\alpha$ -gliadine/ P(HEMA-*co*-SS) est de 1:2 (Moyenne  $\pm$  écart type,  $n = 3$ ).

Toutefois, comme nous l'avons vu au chapitre 2, lors des essais cellulaires, la présence du HEMA est importante pour la biocompatibilité du composé. De plus, la copolymérisation s'est montrée bénéfique lors de la formation de particules avec l' $\alpha$ -gliadine sur une large gamme de concentrations (Liang *et al.* 2010). Ainsi, il faut considérer un équilibre entre la densité de charges et la biocompatibilité, afin d'obtenir une efficacité de complexation, à des quantités de polymères acceptables par voie orale, et ce, sans signe de toxicité (Liang *et al.* 2010).

Dans un second temps, afin d'identifier si la masse molaire influençait la complexation, des P(HEMA-*co*-SS) de composition comparable (*i.e.* 50 % molaire de SS) mais de masses molaires différentes ont été synthétisés. L'impact de la masse molaire du copolymère a été testé sur la complexation de l' $\alpha$ -gliadine à pH 6,8. Ci-dessous se trouvent les caractéristiques des deux polymères testés et de leur capacité de complexation (Tableau 4.3).

Tableau 4-3. Tableau comparatif des deux polymères testés pour estimer l'effet de la masse molaire sur l'efficacité de complexation, à pH 6,8, ratio massique  $\alpha$ -gliadine/polymère 1:2.

Numéro de lot	Masse molaire (kDa) Mn	HEMA (mol%) par RMN $^1\text{H}$	SS (mol%) par RMN $^1\text{H}$	Liaison à la gliadine à pH 6,8 (%)
MN181104	24	57	43	66 $\pm$ 3
MP100506-2	52	45	55	75 $\pm$ 4

Les données ont montré que la masse molaire (24 *versus* 52 kDa), influait peu sur la capacité de complexation des P(HEMA-*co*-SS) (Tableau 4-2). Le P(HEMA-*co*-SS) de 52 kDa présente toutefois une complexation légèrement supérieure à celui de 24 kDa (75 % *versus* 66 %). Une masse molaire de  $\sim 50$  kDa a donc été préférée à celle de 24 kDa, afin de minimiser l'absorption orale de l'agent séquestrant suite à son ingestion. Comparativement, le tolevamer, le séquestrant de la toxine de *C. difficile* qui était en étude clinique jusqu'en 2008 (Ryder 2010), a une masse molaire de  $10^{13}$  kDa (Plone *et al.* 2002).

Ainsi, les études structure/activité ont permis d'identifier une structure de P(HEMA-*co*-SS) (45:55  $\pm$  2 mol%,  $\sim 50$  kDa) qui montrait une bonne capacité de complexation de la gliadine. Désormais, un aspect important à considérer pour un polymère séquestrant est sa spécificité envers la molécule cible, ici l'  $\alpha$ -gliadine (31 kDa).

### 3 Évaluation de la spécificité d'interaction du polymère

L'étude de spécificité du polymère vis-à-vis de l'  $\alpha$ -gliadine effectuée *in vitro* (Chapitre 2, figure 2-1) à pH 6,8 a permis de vérifier que l'administration du polymère ne devrait pas être associée à un risque de carence protéique. Nous avons testé plusieurs protéines qui peuvent se retrouver dans le bol alimentaire de par leur provenance endogène (enzymes digestives) ou exogène (lait, œuf, viande). Les résultats de cette étude ont montré que le copolymère neutralisait préférentiellement l' $\alpha$ -gliadine (Tableau 4-4). Il est aussi important de relever que le polymère ne complexe pas (ou peu) les principales enzymes digestives responsables des clivages protéiques (*i.e.* pepsine, trypsine).

Tableau 4-4. Récapitulatif des protéines utilisées, point isoélectrique (pI) et complexation par le P(HEMA-*co*-SS) à pH 6,8.

Protéine	pI*	Complexation (%)
<b><math>\alpha</math>-gliadine</b>	6	67 $\pm$ 3
<b>Pepsine</b>	3,06	12 $\pm$ 2
<b>Caséine</b>	5,13	< 5
<b>Ovalbumine</b>	5,19	4 $\pm$ 6
<b>Collagénase</b>	5,25	27 $\pm$ 8
<b>BSA</b>	5,6	18 $\pm$ 3
<b>Myoglobine</b>	7,34	6 $\pm$ 6
<b>Trypsine</b>	8,26	< 5
<b>Thrombine</b>	8,88	19 $\pm$ 5
<b>Lysozyme</b>	9,3	< 5

\*Les pI sont des valeurs théoriques obtenues sur [http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) consulté le 23.02.10, par le serveur (ExPaSy) dans le programme M<sub>w</sub>/pI.

Comme évoqué dans la section précédente, les interactions électrostatiques semblent jouer un rôle important dans le phénomène de complexation polymère/protéines (Cooper *et al.* 2005; Liang *et al.* 2009; Liang *et al.* 2010). Il était donc envisageable que le polymère soit capable de séquestrer des protéines hydrophiles chargées positivement. En observant les données sur les protéines hydrosolubles (pI), il ne semble pas y avoir un rapport direct entre le pI et la complexation par le polymère à pH 6.8 (Tableau 4-3). L'état de charge n'est donc pas l'unique composante qui gouverne la séquestration. La spécificité vis-à-vis de la gliadine semble reliée à sa nature hydrophobe et neutre à pH intestinal. Afin de caractériser la nature des interactions (*i.e.* type hydrogène ou hydrophobe) entre les différentes protéines testées et le polymère, il serait intéressant de mener dans le futur des études thermodynamiques afin de déterminer les constantes d'affinité (Cooper *et al.* 2005). Suite à cette caractérisation, il serait aussi judicieux d'effectuer des tests avec des composés de faible masse molaire (*e.g.* vitamines) afin de vérifier si d'autres molécules importantes dans l'alimentation peuvent se lier au polymère.

Il faut cependant garder à l'esprit que l'objectif de cette stratégie thérapeutique est de concevoir un traitement d'appoint et non de remplacer la diète sans gluten. L'usage



envisagé doit rester ponctuel, lorsque l'on ne peut s'assurer que la nourriture est effectivement sans gluten, notamment lors d'occasions particulières (voyages, événements sociaux). Ainsi, l'impact nutritionnel, au vu de ces résultats et du schéma thérapeutique envisagé, semble minime.

En comparaison, il a été considéré que d'autres agents complexants commercialisés, comme le RenaGel® (complexant de phosphate), puissent lier les vitamines liposolubles et les folates en traitement chronique. À ce jour, les études cliniques sur le RenaGel® n'ont montré aucun signe de réduction de la vitamine D (Chertow *et al.* 1999).

#### **4 Évaluation du polymère à prévenir les effets induits par la gliadine sur des modèles cellulaires.**

La muqueuse intestinale repose sur la *muscularis mucosae* et comprend l'épithélium et la lamina propria. L'épithélium est donc la première couche cellulaire de la muqueuse et le maintien de ses fonctions est en interrelation avec le mésenchyme. L'épithélium superficiel dessine des expansions digitiformes intraluminales, les villosités intestinales où logent les cellules responsables de la fonction d'absorption et de digestion de l'intestin : les entérocytes. Ces derniers représentent 80-90% de la population cellulaire totale de l'intestin. Il s'agit de cellules typiquement orientées vers la fonction d'absorption par la présence d'une bordure en brosse apexienne, elle-même constituée par des micro-villosités régulièrement disposées. Chaque microvillosité contient un dispositif micro-filamentaire ayant une composante actine-myosine et possédant des propriétés contractiles. Latéralement, ce complexe micro-filamentaire est en continuité avec les complexes de jonction membranaire apicale qui forment un trait d'union entre les cellules adjacentes. Ces complexes de jonction sont systématiquement composés, de l'apex vers la zone basolatérale, de jonctions serrées, de jonctions adhérentes et de quelques desmosomes sous-jacents associés. Ces jonctions assurent à l'épithélium sa fonction de barrière imperméable aux bactéries et autres grosses macromolécules présentes dans la lumière intestinale.

Dans la littérature, il est recensé que la gliadine a des effets directs sur l'intégrité cellulaire. Des dommages structurels et des perturbations du cytosquelette, indépendants des voies immunitaires impliquées dans la maladie cœliaque, ont été observés (Dolfini *et al.* 2005a; Dolfini *et al.* 2005b). Nous avons donc vérifié si la séquestration par le polymère prévenait ces effets directs de la gliadine sur les cellules.

Des tests sur des cellules cryptales intestinales (IEC-6, Intestinal Epithelial Cell Line 6) ont été effectués, dans un premier temps, pour étudier l'efficacité du polymère à prévenir les effets néfastes de la gliadine sur la structure des cellules. Cette lignée entérocytaire a été isolée à partir de rat nouveau-né (Quaroni *et al.* 1981). Un marquage de l'actine par la phalloïdine-FITC a permis d'analyser les modifications du cytosquelette. Les résultats ont montré que le P(HEMA-*co*-SS) prévenait les effets directs de la gliadine au niveau des contacts intercellulaires et du cytosquelette et ce, de façon dose-dépendante (Chapitre 2, figure 2-3a). Étant donné que le cytosquelette d'actine contrôle directement la formation et la fonction des jonctions serrées (Fanning *et al.* 1998; Fasano 2001), nous avons voulu vérifier, dans un second temps, si le polymère prévenait les effets délétères de la gliadine sur les jonctions serrées. À cette fin, les cellules Caco-2/15, des cellules d'adénocarcinome de côlon ont été utilisées. Ces cellules se différencient fonctionnellement et morphologiquement de façon spontanée suite à l'atteinte de la confluence (Beaulieu *et al.* 1991; Sambuy *et al.* 2005). Les cellules se polarisent et les jonctions serrées se développent au tiers supérieur des entérocytes, empêchant le passage paracellulaire de macromolécules. Le tapis cellulaire obtenu s'apparente à un épithélium intestinal tant au niveau structurel que fonctionnel (Sambuy *et al.* 2005). Ce modèle a été choisi pour étudier l'efficacité du polymère sur les effets de la gliadine au niveau des jonctions serrées (*i.e.* structure et fonction).

Des cellules Caco-2/15 à 8 jours post-confluence ont été traitées par de la gliadine en présence ou non de P(HEMA-*co*-SS). Puis les cellules ont été fixées pour obtenir des coupes transversales du tapis cellulaire. Comme précédemment rapporté par Drago *et al.* (2006), la gliadine affecte l'expression de ZO-1, une protéine de jonction serrée. Les résultats en immunofluorescence (Chapitre 2, figure 2-3b) démontrent que le polymère

prévient la dérégulation des jonctions serrées en maintenant l'expression de la ZO-1. Les jonctions serrées semblent donc conserver leur intégrité, en présence de gliadine et de P(HEMA-*co*-SS), ce qui, de façon subséquente, empêcherait le passage paracellulaire de macromolécules comme les peptides immunomodulateurs (Fasano 2001; Fasano 2008).

Pour confirmer l'observation structurelle d'immunofluorescence, un test fonctionnel de perméabilité au  $^3\text{[H]}$ -mannitol a été réalisé sur des Caco-2/15, 15 jours après confluence. Le  $^3\text{[H]}$ -mannitol sert de sonde macromoléculaire (voir annexe 4). La perméabilité apparente a été calculée avec la formule suivante (Tavelin *et al.* 2003):

$$P_{app} = \frac{\frac{dC_t}{dt}}{AC_0}$$

où  $C_t$  représente la concentration de mannitol accumulée dans le compartiment basal en fonction du temps (seconde),  $C_0$  la concentration initiale de mannitol dans le compartiment apical (mol/mL) et  $A$  la surface du filtre ( $\text{cm}^2$ ). Une plus forte accumulation de radioactivité est observée lorsque les cellules sont exposées à la gliadine seule (Figure 4-2). Le polymère semble prévenir les effets induits par la gliadine sur le passage du mannitol. De plus, le polymère seul n'engendre pas d'augmentation du flux de mannitol (Figure 4-2). Cette observation se reflète au niveau des valeurs de la perméabilité apparente, bien que nous n'ayons pas réussi à démontrer une différence statistiquement significative en raison de la grande variabilité des résultats (Figure 4-3).

Nos résultats concordent avec les observations effectuées par Drago *et al* (2006). Leur étude sur des Caco-2 a montré une altération de la monocouche cellulaire, mesurée par la diminution significative de la résistivité en présence de gliadine (TEER passant de 300 à 50  $\Omega.\text{cm}^2$ ). Dans notre cas, l'augmentation du passage du mannitol constatée révèle une altération de l'intégrité de la monocouche. Cependant, les effets observés lors de notre étude sont moins importants, ce qui peut être relié aux conditions expérimentales différentes. En effet, nous avons utilisé la gliadine native et non de la gliadine digérée pour corréler les observations faites par immunofluorescence. Certains peptides de digestion de

la gliadine se lie au récepteur CXCR3 et entraînent une augmentation de la perméabilité via la libération de zonuline (Lammers *et al.* 2008). Il est concevable que la protéine une fois digérée dévoile un plus grand nombre de séquences réactives, entraînant une augmentation des effets observés.

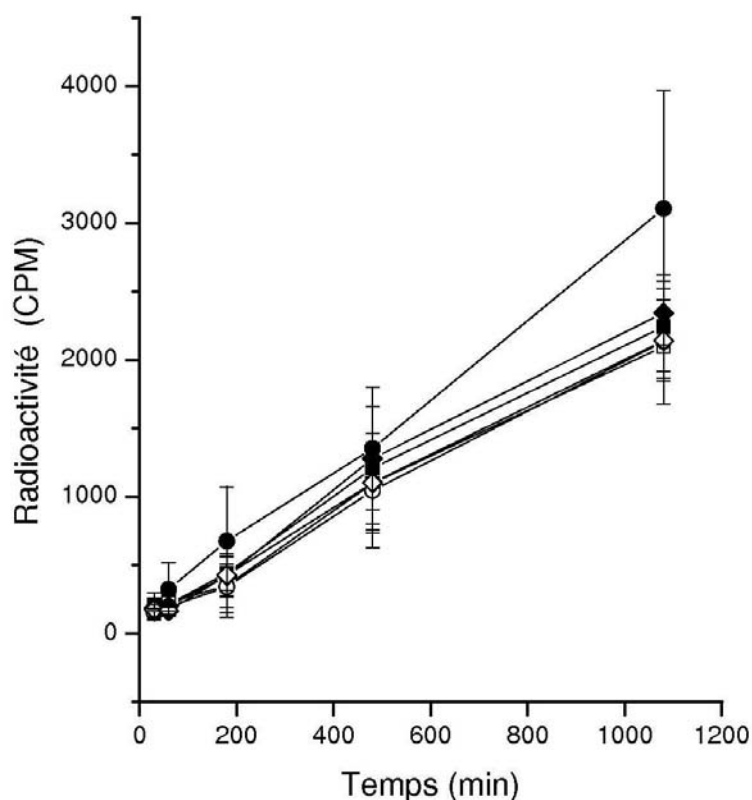


Figure 4-2. Cumul du  $^3\text{H}$ -mannitol au niveau de la face basale des cellules. La stimulation des Caco-2/15, par la gliadine (gliadine 0,5 mg/mL (●)) augmente le passage du  $^3\text{H}$ -mannitol vers le compartiment basal comparativement au contrôle négatif (BSA 0,5 mg/mL (■)). Les autres groupes tests (gliadine + P(HEMA-co-SS) 1:1 (*m/m*) (○), gliadine + P(HEMA-co-SS) 1:2 (*m/m*) (◆), P(HEMA-co-SS) 1 mg/mL (◇)) présentent des valeurs de radioactivité similaires au contrôle négatif (2 expériences, chaque puits en triplicata, moyenne  $\pm$  écart type).

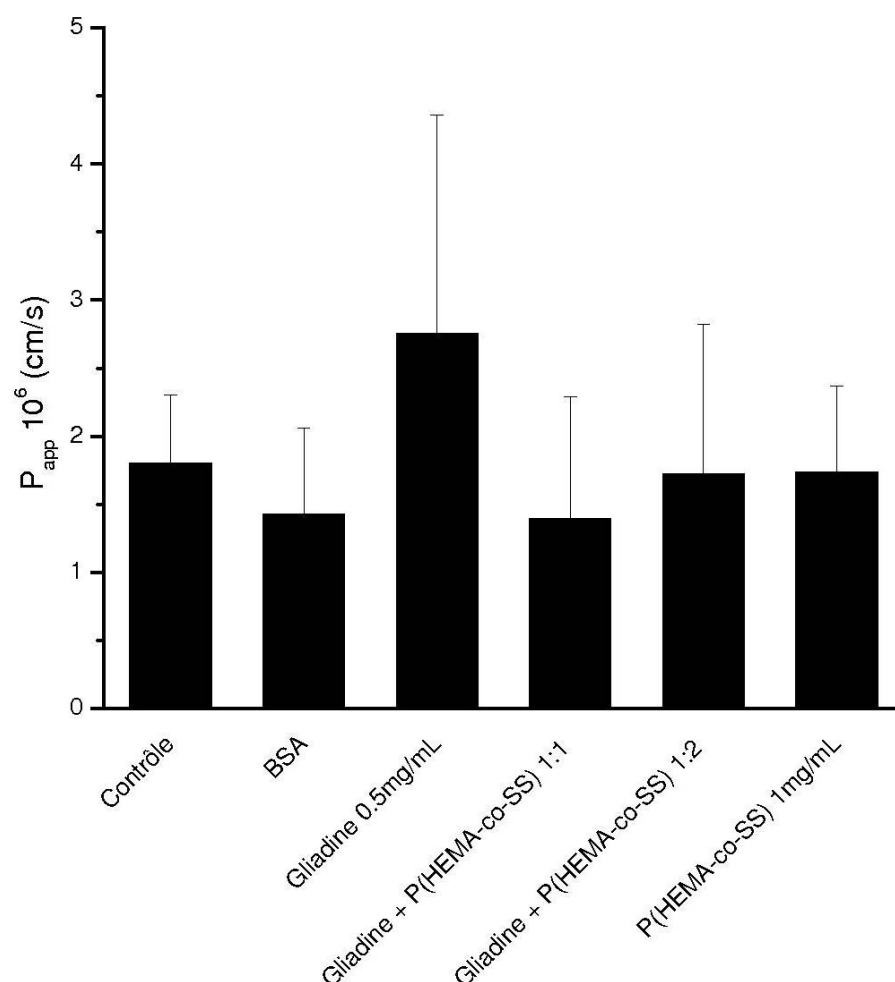


Figure 4-3. Perméabilité apparente du mannitol à 180 min (2 expériences, chaque puits en triplicata, moyenne  $\pm$  écart type).

Enfin, des PCDE (Primary Cultures of Differentiated Enterocyte), des cultures primaires d'entérocytes différenciés, ont été utilisées afin de tester la capacité du polymère à prévenir la cytotoxicité de la gliadine sur un modèle de cellules épithéliales humaines. Ces cellules sont obtenues à partir d'intestins de fœtus humain de 16 à 18 semaines, par traitement à l'aide de Matrisperse<sup>®</sup> (Perreault *et al.* 1998). Cette méthode permet de recueillir les cellules épithéliales des villosités. Dans le développement fœtal humain, l'épithélium est quasiment formé dès 12-13 semaines de gestation (Ménard *et al.* 2006). Ces cellules

présentent donc les caractéristiques des cellules humaines différenciées et sont donc un modèle très pertinent de l'épithélium intestinal humain. Ces cellules, par un test au bleu trypan, ont permis de tester l'efficacité du polymère à prévenir la cytotoxicité de la gliadine ainsi qu'à montrer que le polymère n'était pas cytotoxique à la concentration testée (Chapitre 2, figure 2-4 et figure supplémentaire 2-2). Il est intéressant de noter que les cellules saines sont sensibles à l'exposition aiguë à la gliadine, alors que des biopsies intestinales de patients sains ne le sont pas (Maiuri *et al.* 2003; Drago *et al.* 2006). Une biopsie est un tissu composé de différentes couches cellulaires mais pas uniquement de cellules épithéliales. Les différentes couches cellulaires sont en interrelation constante pour assurer l'instauration et le maintien des fonctions de même que la survie des cellules épithéliales. Ainsi, cette différence dans la réponse à la gliadine peut s'expliquer par la plus grande sensibilité de notre modèle *in vitro* composé exclusivement de cellules épithéliales différenciées.

En résumé, la séquestration par le P(HEMA-*co*-SS) a permis de prévenir les effets cellulaires délétères induits directement par la gliadine envers les entérocytes et ce, au niveau du cytosquelette, des jonctions serrées et d'enrayer la toxicité de la protéine.

## **5 Évaluation de la capacité du polymère à diminuer la digestion enzymatique de la gliadine, du gluten et de l'hordéine et ainsi qu'à moduler la réponse immunitaire.**

Il a été récemment rapporté que la barrière intestinale est la cible initiale des peptides pathogènes issus de la digestion de la gliadine (Thomas *et al.* 2006; Lammers *et al.* 2008) chez les personnes prédisposés à la maladie cœliaque. L'effet de la séquestration de la gliadine par le P(HEMA-*co*-SS) sur la dégradation enzymatique a d'abord été étudié *in vitro*.

L'analyse des tracés HPLC des produits de digestion de l' $\alpha$ -gliadine (Chapitre 2, figure supplémentaire 2-3) a montré une diminution des aires sous la courbe des pics des produits

de dégradation enzymatique de l' $\alpha$ -gliadine en présence de P(HEMA-*co*-SS). Un tracé plus détaillé (Chapitre 2, figure 2-5) a démontré une diminution de 80 % de l'aire du pic correspondant au peptide 13mer, impliqué dans la réponse innée de la maladie (LGQQQPFPPQQPY (Maiuri *et al.* 2003)), suggérant une diminution de sa formation. Des résultats ultérieurs (LC-MS), (Chapitre 3, figure supplémentaire 3-1) ont permis de confirmer la diminution de cette séquence de ~ 60-70 %. Une étude complémentaire sur la dégradation enzymatique de gluten de blé (un mélange complexe de gliadine et gluténines) a montré que le copolymère prévient la formation de séquences peptidiques incriminées dans la voie de l'immunité acquise (Arentz-Hansen *et al.* 2000) de 70 % et de 30 % respectivement pour les séquences QLQPFPPQQLPY et PQQQLPYPQQQLPYPQQPQPF (Chapitre 3, figure 3-1). Le tracé (Figure 4-4) montre spécifiquement la diminution de formation du peptide QLQPFPPQQLPY lorsque le gluten est incubé avec le P(HEMA-*co*-SS) lors de la digestion. De plus, les essais de complexation de diverses protéines (Chapitre 2, figure 2-1 et tableau 4-3) ont montré que le polymère séquestre très faiblement les enzymes digestives majeures (*i.e.* pepsine et trypsine). Ces données indiquent que la diminution des peptides de dégradation n'est pas la conséquence de la séquestration de ces enzymes. D'autres séquences de ces produits de digestion ont été repartitionnées. Notamment, les séquences YPTSPQQSGQGQQL et LQPQQPFPPQQPQQPFPQ, dont la formation est diminuée de 70% et 25-30% (Chapitre 3, figure supplémentaire 3-2). Ces résultats sont intéressants car ces séquences ont été rapportées comme stimulantes de lymphocytes T issus de patients souffrant de la maladie cœliaque (Vader *et al.* 2003a; Tye-Din *et al.* 2010).

Bien qu'invasive, l'étude sur des biopsies de patients cœliaques est le modèle le plus optimal pour observer l'effet du polymère (au chapitre 3). Cette étude a permis d'observer que l'entrave de la digestion par le P(HEMA-*co*-SS) permet de moduler le schéma de sécrétion des cytokines (Chapitre 3, figure 6). En effet, dans un milieu contenant le produit de digestion de la gliadine en présence de polymère, la sécrétion TNF- $\alpha$  est abolie (*i.e.* similaire au contrôle), comparativement aux cellules stimulées par le produit de digestion de la gliadine en l'absence de polymère, tout en conservant la sécrétion d'IL-10. Cet effet est extrêmement intéressant car le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire et l'IL-10 est une cytokine régulatrice de l'immunité. Cette dernière agit sur les cellules présentatrices

d'antigènes en inhibant la synthèse des cytokines inflammatoires, ainsi que l'expression de molécules stimulatrices et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II (Fiorentino *et al.* 1991a; Fiorentino *et al.* 1991b). De plus, cette cytokine interfère avec la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (De Waal Malefyt *et al.* 1993; Taga *et al.* 1993). Plus particulièrement, elle diminue l'activation des lymphocytes T par la gliadine (Salvati *et al.* 2005). Cette modulation de la réponse immunitaire des biopsies montre le bénéfice thérapeutique potentiel de l'utilisation du polymère.

Les études menées *in vivo* (Chapitres 2 et 3) visaient à vérifier que le copolymère permettait de protéger de façon efficace la gliadine et le gluten de blé de la dégradation dans le tractus gastro-intestinal. Grâce à la diminution de la formation des peptides immunogènes, les effets pathologiques de ces derniers devaient être atténués, voire supprimés. Tout comme le choix des types cellulaires, le choix du modèle animal est crucial afin d'avoir des résultats pertinents. Il n'existe pas de modèle vivant parfait de la maladie cœliaque. Nos expériences ont été menées sur des souris transgéniques HLA/HCD4-DQ8. Ces souris présentent une double modification génétique. Ainsi, elles expriment les molécules HLA-DQ8 du complexe majeur d'histocompatibilité humain (sur les cellules présentatrices d'antigènes) et les molécules du CD4 (sur les lymphocytes T), mais ne présentent pas les molécules d'histocompatibilité murines (Black *et al.* 2002). Ces souris ont été retenues car elles présentent une sensibilité au gluten (Black *et al.* 2002), une activation de l'immunité et une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale (Verdu *et al.* 2008). A ce jour, c'est l'un des modèles les plus adaptés pour l'étude des effets de la gliadine, CMH II-dépendants et indépendants (Black *et al.* 2002 ; Verdu *et al.* 2008). Bien qu'elles développent une forte réponse contre la gliadine, les souris HLA/HCD4-DQ8 sont dénuées d'atteintes morphologiques (Verdu *et al.* 2008). Ce modèle murin a été utilisé pour tester d'autres approches thérapeutiques dans la maladie cœliaque comme l'induction de tolérance par voie nasale (Senger *et al.* 2003), les effets de probiotiques (D'Arienzo *et al.* 2009) et l'inhibiteur de la zonuline (Durai *et al.* 2009).

Les résultats présentés aux chapitres 2 et 3 montrent que le P(HEMA-*co*-SS) atténue significativement les effets *in vivo* de la gliadine et du gluten de blé. Les souris traitées par le polymère avant le gavage avec la gliadine ont montré une diminution des lymphocytes CD3+ et des cellules F4/80. La figure 2-7 suggère que les antigènes pathogènes sont



séquestrés ou peu produits *in vivo*. De surcroît l'observation, effectuée ultérieurement, (Chapitre 3, figure 3-4) relative à la diminution de la sécrétion des IgA anti-gliadine suggère que la gliadine est masquée par le P(HEMA-*co*-SS). Enfin, les effets induits par la gliadine au niveau des fonctions de la barrière épithéliales sont abolis lors d'une pré-administration de polymère, et ce, même en présence d'un mélange complexe contenant du gluten de blé (Chapitre 2, figure 2-6 et chapitre 3, figure 3-3). Ces résultats démontrent que le polymère prévient les effets induits au niveau épithélial par les peptides incriminés dans la maladie cœliaque. De plus, le traitement *in vivo* avec le polymère diminue l'activation des splénocytes *ex vivo* comparativement aux cellules de souris gavées uniquement avec le mélange contenant du gluten (Chapitre 3, figure 3-4). Cette observation évoque qu'*in vivo*, les animaux n'ont pas (ou peu) été en contact avec l'antigène (*i.e.* le produit de digestion) de façon systémique. L'analyse de cette réponse a montré une augmentation de l'IL-10 ( $\times 2$ ), une diminution de MCP-1 ( $\sim 45\%$ ) et du TNF- $\alpha$  ( $\sim 55\%$ ) lorsque les souris avaient reçu le polymère (Chapitre 3, figure 3-5). Ces résultats suggèrent une inversion vers une réponse anti-inflammatoire.

Ce faisceau d'indices porte à croire que le complexe P(HEMA-*co*-SS)/gliadine (Liang *et al.* 2009) est stable dans les conditions drastiques du tube digestif. La formation des peptides toxiques à partir de la gliadine, même contenue dans un mélange complexe serait diminuée, à la fois *in vitro* et *in vivo* comme le suggère la diminution des effets observés chez les souris sensibles au gluten. Ainsi, le P(HEMA-*co*-SS) permet d'inhiber précocement la cascade pathologique, tout comme la prise orale de prolylendopeptidases (Pyle *et al.* 2005; Gass *et al.* 2007) ou de l'inhibiteur de zonuline (Kelly *et al.* 2009). Ce dernier vise à maintenir les fonctions de la barrière épithéliale afin d'empêcher le passage des peptides pathogènes vers la *lamina propria*. Les enzymes, tout comme notre polymère, tendent à diminuer la toxicité des peptides. Elles agissent en clivant les peptides résistants à la digestion et produisent des entités moins immunoréactives. Notre approche, quant elle, cherche à éviter leur formation en excréant la protéine dans les selles.

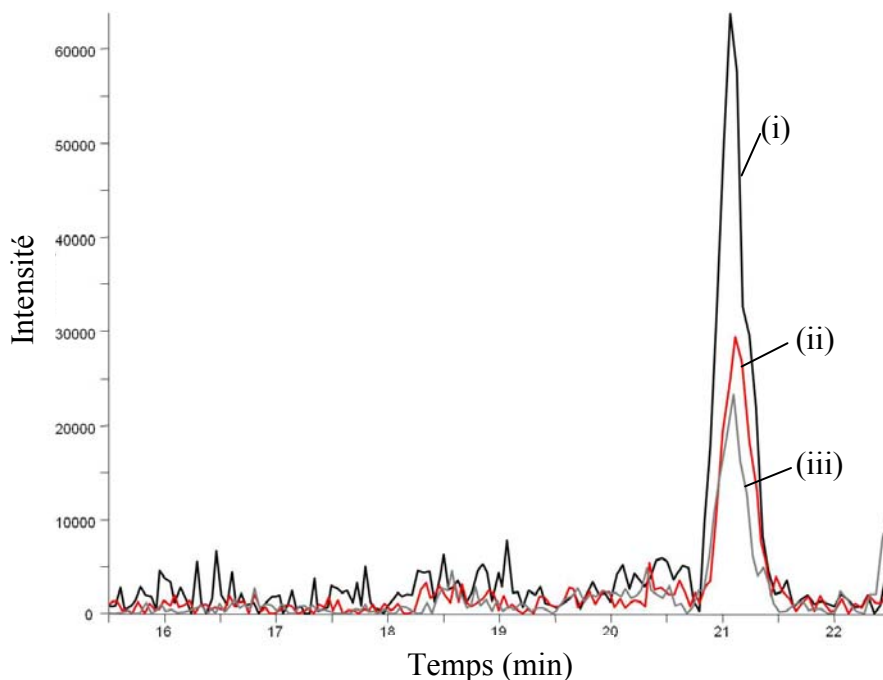


Figure 4-4. Tracé de LC-MS du gluten digéré en l'absence (i) ou en présence de P(HEMA-co-SS). Gluten/polymère (ratio massique) 1:1 (ii) and 2:3 (iii) (spectre pour  $m/z = 1455.30$ - $1456.30$  correspondant au peptide QLQPFQPQLPY).

Des expériences complémentaires ont été effectuées sur des produits de digestion de la prolamine issue de l'orge, l'hordéine, afin de tester l'aptitude du polymère à diminuer la production de séquences issues de l'hordéine impliquées dans la maladie cœliaque. La formation des séquences PQQPQQPFPFPQQPFRQ et PQQPFPQQPQQPFPQQPFP a été réduite respectivement de 40-45% et 60-65% (Chapitre 3, figure supplémentaire 3-3). Ces observations sont particulièrement intéressantes car ces peptides sont rapportés en tant que stimulants de lymphocytes issus de patients souffrant de la maladie cœliaque (Vader *et al.* 2003a; Tye-Din *et al.* 2010).

## 6 Innocuité du polymère

Les polymères séquestrants oraux sont des composés non absorbés et habituellement bien tolérés même à dose élevée et avec un schéma d'administration chronique (Dhal *et al.* 2006). Par exemple, le Kayexalate<sup>®</sup> est administré jusqu'à 60 g/jour, le Questran<sup>®</sup> jusqu'à 24 g/jour et le RenaGel<sup>®</sup> jusqu'à 12 g/jour (Dorosz 2009). Afin de s'assurer que notre composé polymère réponde à ces exigences, divers essais ont été menés.

Les cellules IEC-6 ont été utilisées pour évaluer l'effet du polymère sur la structure des cellules. Un marquage de l'actine par la phalloïdine-FITC a permis d'étudier les modifications du cytosquelette. En premier lieu, des essais comparant le PEG (35 kDa), le P(HEMA-*co*-SS) (40 kDa, 55:45 mol%) et l'homopolymère de styrène sulfonate (PSS) (57 kDa) ont été réalisés. Les deux premiers polymères, à concentration identique, se sont avérés inertes contrairement au PSS qui a entraîné des perturbations du cytosquelette (Chapitre 2, figure 2-2). Afin d'expliquer cette observation, des essais de déstabilisation membranaire avec des liposomes de dimyristylphosphatidylcholine (DMPC) et de cholestérol (chol) ont été réalisés. Ces liposomes permettent de modéliser la bicouche lipidique cellulaire. Les liposomes de DMPC/chol (7:3 mol/mol) ont été produits par la méthode d'évaporation-réhydratation (Dhanikula *et al.* 2006) suivie d'une extrusion sur membrane de polycarbonate. Des vésicules de ~180 nm de diamètre ont été obtenues (voir annexe 5). Ces dernières ont été incubées avec des solutions de PSS ou de P(HEMA-*co*-SS). Après 30 min (temps d'incubation de l'expérience cellulaire), nous avons noté que la taille des liposomes incubés avec le PSS augmentait davantage que dans le cas du P(HEMA-*co*-SS) (Tableau 4-5). L'interaction était très marquée à 5 mg/mL avec une taille moyenne de 730 nm en présence de PSS comparativement à 462 nm avec le P(HEMA-*co*-SS) (Tableau 4-5). Ainsi, il est possible que le PSS interfère avec la membrane cellulaire et, de façon subséquente, perturbe le cytosquelette ou les voies de signalisation, entraînant des dérèglements cellulaires plus marqués que le P(HEMA-*co*-SS). De plus, il est aussi recensé que les polyanions, plus spécifiquement les polysulfates, sont susceptibles de générer l'apoptose cellulaire (Gaspar *et al.* 2009). Ces données nous ont amenées à écarter le PSS.

Tableau 4-5. Diamètre des liposomes de DMPC:chol (7:3 mol/mol) incubés en présence de PSS ou de P(HEMA-*co*-SS).

	<i>PSS</i>		<i>P(HEMA-co-SS)</i> (45:55 ± 2 mol%)	
	<i>Taille (nm)</i>	<i>PdI</i>	<i>Taille (nm)</i>	<i>PdI</i>
<b>2 mg/mL</b>				
<i>t</i> = 1 min	344	0.34	284	0,43
<i>t</i> = 30 min	468	0.19	344	0,20
<b>5 mg/mL</b>				
<i>t</i> = 1 min	640	0.52	383	0,28
<i>t</i> = 30 min	730	0.17	463	0,28

Les expériences conduites avec les cellules PDCE ont démontré que le polymère n'a pas d'effet cytotoxique sur des cellules épithéliales intestinales humaines (Chapitre 2 figure 2-4 et figure supplémentaire 2-2). Les essais menés sur les cellules Caco-2/15 au niveau des jonctions serrées n'ont pas montré de perturbations structurelles ni fonctionnelles engendrées par le polymère seul (Chapitre 2, figure 2-3). Ces résultats ont été corroborés *in vivo*. Les souris traitées uniquement avec du polymère ne présentent pas d'altération des fonctions épithéliales intestinales (Chapitre 2, figure 2-6). Ces mêmes animaux ont démontré des niveaux de cellules CD3<sup>+</sup> et F4/80 comparables aux souris du groupe témoin. (Chapitre 2, figure 2-7). Les études menées au chapitre 3 (Figure 3-7) avec les biopsies de patients souffrant de la maladie cœliaque ont démontré que le polymère n'engendre pas de libération de TNF- $\alpha$ . Cette information est intéressante, car la prise orale de polymère ne semble pas à même d'engendrer une inflammation.

Des études conduites sur des souris saines (~ 20 g) ont permis de mettre en évidence l'innocuité du polymère et ce, même suite à une administration prolongée à forte dose (830 mg/j durant 22 jours soit environ 40 g/kg/j). Les souris n'ont montré aucun signe de mal-être ni de perte de poids. L'étude des paramètres biochimiques et hématologiques n'a pas dévoilé de toxicité (Chapitre 2, figure 2-8). Enfin, aucune anomalie histologique n'a été recensée au niveau du jéjunum, du foie et de l'estomac. Ces résultats ont été complétés dans un second temps (Chapitre 3) par les études d'absorption orale en administrations chronique et aiguë (Chapitre 3, figures supplémentaires 3-2 et 3-3). Les résultats montrent

que le polymère n'est pas absorbé et est éliminé dans les selles (93-100 %). Des résultats similaires ont été obtenus chez des souris sensibilisées à la gluten ayant une perméabilité intestinale augmentée (Chapitre 3, figure 3-3). Ces résultats d'absorption orale sont similaires à ceux observés pour le RenaGel<sup>®</sup>, pour lequel 98 à 100 % du polymère est excrété dans les selles (Plone *et al.* 2002). Ainsi, le P(HEMA-*co*-SS) semble biocompatible, sécuritaire et non absorbé.

## Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Ce projet est original tant au point de vue de l'approche thérapeutique que de la thématique. Les polymères sont largement utilisés pour des applications pharmaceutiques, cependant leur utilisation en tant que séquestrants oraux reste encore marginale. Une autre originalité du projet repose sur la recherche de thérapies pour la maladie cœliaque. Il existe actuellement diverses approches dans le traitement de cette maladie. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que ces traitements ne visent pas à remplacer une diète sans gluten qui reste à l'heure actuelle le seul traitement de référence. L'objectif est de proposer un traitement d'appoint, complémentaire à la diète sans gluten, susceptible d'améliorer la qualité de vie des patients et de mieux contrôler leur pathologie. Dans un avenir proche, les recherches les plus prometteuses reposeront sur l'utilisation d'enzymes pour cliver les peptides pathogènes résistants à la digestion (Stepniak *et al.* 2006; Gass *et al.* 2007) ou sur le maintien des fonctions de la barrière épithéliale intestinale en bloquant l'ouverture des jonctions serrées (Paterson *et al.* 2007; Durai *et al.* 2009). Notre stratégie vise plutôt à agir en amont de la cascade réactionnelle pathologique, en séquestrant la gliadine et en empêchant la formation des peptides immuno-modulateurs. Les résultats présentés ici indiquent que cette stratégie pourrait fonctionner.

Dans un premier temps, l'étude de la complexation de l' $\alpha$ -gliadine avec différents polymères a permis d'identifier des agents séquestrants capables de capturer de façon efficace la gliadine à pH intestinal et gastrique.

Dans un second temps, le P(HEMA-*co*-SS) a montré sa capacité à séquestrer l' $\alpha$ -gliadine, et ce, sélectivement comparativement à d'autres protéines retrouvées dans l'intestin. Ce copolymère s'est avéré capable de prévenir les effets induits par la gliadine sur des cellules épithéliales intestinales en culture (IEC-6, Caco-2/15, PCDE) sans montrer de signe de toxicité. Des essais de digestion de l' $\alpha$ -gliadine et du gluten *in vitro* ont montré que le P(HEMA-*co*-SS) minimise la digestion enzymatique des protéines, diminuant la formation

des peptides toxiques. Dans un modèle de souris sensibles au gluten, le polymère prévient les effets induits par la gliadine au niveau des fonctions de la barrière intestinale et des paramètres immunitaires et ce, même en présence d'un mélange complexe contenant du gluten de blé et d'autres composants alimentaires. Enfin, des études sur des biopsies de patients souffrant de maladie cœliaque ont montré une modulation de la réponse immunitaire lorsque la digestion était réalisée en présence de copolymère, notamment une abolition de la sécrétion de TNF- $\alpha$ .

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à la toxicité du P(HEMA-*co*-SS). Tout d'abord des études sur des souris saines ont mis en évidence l'innocuité du polymère. Ensuite, des études de biodistribution ont été menées sur des rats sains et sur les souris sensibles au gluten qui présentent une barrière intestinale altérée. Toutes les études ont permis de s'assurer que le polymère n'est pas absorbé et ont révélé que le copolymère est excrété dans les selles des animaux en quasi-totalité. L'ensemble des données démontre la sécurité et l'efficacité du P(HEMA-*co*-SS) au niveau cellulaire et animal. Elles témoignent d'une possible utilisation sécuritaire d'un polymère dans le traitement des pathologies associées à la sensibilité au gluten, comme la maladie cœliaque.

Des travaux complémentaires portant sur l'analyse des interactions  $\alpha$ -gliadine/polymère principalement pH 6,8 seraient nécessaires, afin d'élucider le mécanisme d'interaction complémentaire aux associations électrostatiques. Par exemple, des études calorimétriques peuvent être envisagées.

Les travaux futurs viseront à optimiser la synthèse dans des bonnes conditions de fabrication et à caractériser de façon approfondie le polymère afin de satisfaire aux exigences imposées par les autorités sanitaires pour des essais cliniques. La synthèse des copolymères a été effectuée par polymérisation radicalaire par transfert d'atome. Cette voie de synthèse permet d'obtenir un faible indice de polymolécularité. De plus, ce procédé de synthèse est facilement transposable en production industrielle. La purification nécessite une optimisation afin de s'assurer de la reproductibilité et de la qualité lot à lot (*i.e.* l'absence d'impureté ou de solvant résiduel ; dans notre cas, l'absence de monomères, de

complexe catalytique et de méthanol). Des études de stabilité du polymère à long terme sont aussi à envisager afin de prévoir une date de péremption du composé.

Enfin, des travaux complémentaires de toxicité et d'efficacité sont nécessaires sur les souris transgéniques HCD4/DQ8. Des essais de toxicité avec des doses croissantes de polymère et des tests d'efficacité avec le gluten d'orge et de seigle permettraient de tester l'efficacité du polymère *in vivo* vis-à-vis de ces céréales. D'autre part, des travaux additionnels avec un autre modèle animal, comme le modèle du primate sensible au gluten (Bethune *et al.* 2008a; Bethune *et al.* 2008b) seraient particulièrement intéressants. L'utilisation des macaques permettrait de confirmer la non-absorption du polymère chez un modèle primate. De surcroît, ce modèle de macaque sensible au gluten permettrait de s'assurer que le polymère prévient la formation des Ig sériques (IgA anti-gliadine et IgG anti-transglutaminase tissulaire), ainsi que l'atrophie villositaire sous régime contenant du gluten. Il est vrai que ce modèle est rare (prévalence 0,6 %) et que la dépendance du CHM II dans ce modèle n'est pas encore élucidée (Bethune *et al.* 2008a; Marietta *et al.* 2009). Cependant, ces résultats complémentaires permettraient de confirmer que la neutralisation très précoce du gluten par le polymère inhibe l'activation de toutes les voies de signalisation ainsi que les cellules impliquées dans le développement de la pathologie. Ce modèle commence à être utilisé pour tester la détoxification du gluten par l'enzyme EP-B2 (Bethune *et al.* 2008b).

Pour conclure, les résultats de ce projet original auront certainement des retombées dans le traitement des intolérances au gluten. En effet, les résultats obtenus permettent raisonnablement d'envisager prochainement des études cliniques. Cette approche peut potentiellement s'inscrire dans le futur arsenal thérapeutique de la maladie cœliaque pour améliorer la qualité de vie des patients.



## Bibliographie des chapitres 4 et 5

- Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M., Lundin, K. E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L. M. and McAdam, S. N. (2000). "The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase." J Exp Med **191**(4): 603-12.
- Baron, M. (2003). "An overview of the Notch signalling pathway." Semin Cell Dev Biol **14**: 113-119.
- Beaulieu, J. F. and Quaroni, A. (1991). "Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells." Biochem J **280** ( Pt 3): 599-608.
- Bernardin, J. E., Kasarda, D. D. and Mecham, D. K. (1967). "Preparation and characterization of alpha-gliadin." J Biol Chem **242**(3): 445-50.
- Bethune, M. T., Borda, J. T., Ribka, E., Liu, M. X., Phillippi-Falkenstein, K., Jandacek, R. J., Doxiadis, G. G. M., Gray, G. M., Khosla, C. and Sestak, K. (2008a). "A Non-Human Primate Model for Gluten Sensitivity." Plos One **3**(2).
- Bethune, M. T., Ribka, E., Khosla, C. and Sestak, K. (2008b). "Transepithelial transport and enzymatic detoxification of gluten in gluten-sensitive rhesus macaques." PLoS One **3**(3): e1857.
- Black, K. E., Murray, J. A. and David, C. S. (2002). "HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice." J Immunol **169**(10): 5595-600.
- Chertow, G. M., Burke, S. K., Dillon, M. A. and Slatopolsky, E. A. (1999). "Long-term effects of sevelamer hydrochloride on the calcium X phosphate product and lipid profile of haemodialysis patients." Nephrol Dial Transplant **14**: 2907-2014.
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B. and Turksen, S. (2005). "Polyelectrolyte-protein complexes." Curr Opin Colloid Interface Sci **10**(1-2): 52-78.
- Cooper, C. L., Goulding, A., Kayitmazer, A. B., Ulrich, S., Stoll, S., Turksen, S., Yusa, S., Kumar, A. and Dubin, P. L. (2006). "Effects of polyelectrolyte chain stiffness, charge mobility, and charge sequences on binding to proteins and micelles." Biomacromolecules **7**(4): 1025-35.
- D'Arienzo, R., Maurano, F., Lavermicocca, P., Ricca, E. and Rossi, M. (2009). "Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity." Cytokine **48**(3): 254-259.

- De Waal Malefyt, R., Yssel, H. and De Vries, J. E. (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-65.
- Dhal, P. K., Holmes-Farley, R. S., Huval, C. C. and Jozefiak, T. H. (2006). "Polymers as drugs." Adv Polym Sci **192**: 9-58.
- Dhanikula, A. B., Lafleur, M. and Leroux, J.-C. (2006). "Characterization and in vitro evaluation of spherulites as sequestering vesicles with potential application in drug detoxification." Biochim Biophys Acta **1758**(11): 1787-1796.
- Dolfini, E., Elli, L., Roncoroni, L., Costa, B., Colleoni, M. P., Lorusso, V., Ramponi, S., Braidotti, P., Ferrero, S., Falini, M. L. and Bardella, M. T. (2005a). "Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model." World J Gastroenterol **11**(38): 5973-7.
- Dolfini, E., Roncoroni, L., Elli, L., Fumagalli, C., Colombo, R., Ramponi, S., Forlani, F. and Bardella, M. T. (2005b). "Cytoskeleton reorganization and ultrastructural damage induced by gliadin in a three-dimensional in vitro model." World J Gastroenterol **11**(48): 7597-601.
- Dorosz, P. (2009). Guide pratique des médicaments. Ed. Maloine, Paris.
- Drago, S., El Asmar, R., Di Pierro, M., Grazia Clemente, M., Tripathi, A., Sapone, A., Thakar, M., Iacono, G., Carroccio, A., D'Agate, C., Not, T., Zampini, L., Catassi, C. and Fasano, A. (2006). "Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines." Scand J Gastroenterol **41**(4): 408-19.
- Durai, M., Kitchens, K., Somerville, R., Gopalakrishnan, S., Tamiz, A., Pandey, N., Verdu, E. F. and Alkan, S. (2009). Lazarotide acetate inhibits the intestinal permeability-inflammatory loop caused by gliadin and cytokines in vitro and in vivo. Coeliac disease symposium Amsterdam.
- Eichhorn, M. (1970). Handbook of biochemistry selected data for molecular biology. Ohio, The chemical Rubber Co.
- ExPaSy. "Serveur de protéomique." Retrieved 23.02.2010, from [http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. and Anderson, J. M. (1998). "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton." J Biol Chem **273**(45): 29745-53.
- Fasano, A. (2001). "Intestinal zonulin: open sesame!" Gut **49**(2): 159-62.

- Fasano, A. (2008). "Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall." Am J Pathol **173**(5): 1243-52.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A. (1991a). "IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages." J Immunol **147**(11): 3815-22.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W. and O'Garra, A. (1991b). "IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells." J Immunol **146**(10): 3444-51.
- Gaspar, R. and Duncan, R. (2009). "Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics." Adv Drug Deliv Rev **61**(13): 1220-1231.
- Gass, J., Bethune, M. T., Siegel, M., Spencer, A. and Khosla, C. (2007). "Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue." Gastroenterology **133**(2): 472-80.
- Iddon, P. D., Robinson, K. L. and Armes, S. P. (2004). "Polymerization of sodium 4-styrene sulfonate via atom transfer radical polymerization in protic media." Polymer **45**(3): 759-768.
- Kelly, C. P., Green, P. H., Murray, J. A., DiMarino, A. J., Arsenescu, R. I., Colatrella, A. M., Leffler, D. A., Alexander, T. J., Jacobstein, D., Leon, F., Jiang, J. and Fedorak, R. N. (2009). "Safety, tolerability and effects on intestinal permeability of larazotide acetate in celiac disease: results of a phase IIB 6-week gluten-challenge clinical trial." Gastroenterology **136**(5, Supplement 1): A-474.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., vanWichen, D., deWeger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Clevers, H. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-1787.
- Lammers, K. M., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S., Netzel-Arnett, S., Antalis, T., Vogel, S. N. and Fasano, A. (2008). "Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3." Gastroenterology **135**(1): 194-204 e3.
- Liang, L., Pinier, M., Leroux, J. C. and Subirade, M. (2009). "Interaction of alpha-gliadin with poly(HEMA-co-SS): structural characterization and biological implication." Biopolymers **91**(2): 169-78.

- Liang, L., Pinier, M., Leroux, J. C. and Subirade, M. (2010). "Interaction of alpha-gliadin with polyanions: design considerations for sequestrants used in supportive treatment of celiac disease." Biopolymers **93**: 418-28.
- Liu, S., Maheshwari, R. and Kiick, K. L. (2009). "Polymer-Based Therapeutics." Macromolecules **42**(1): 3-13.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S. and Londei, M. (2003). "Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease." Lancet **362**(9377): 30-7.
- Marietta, E. V., Schuppan, D. and Murray, J. A. (2009). "In vitro and in vivo models of celiac disease." Expert Opin Drug Discov **4**(11): 1113-1123.
- Matyjaszewski, K. and Xia, J. (2001). "Atom transfer radical polymerization." Chem Rev **101**(9): 2921-90.
- Ménard, D., Beaulieu, J. F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N. and Vachon, P. H. (2006). Gastrointestinal tract. Cell signaling and growth factors in development: from molecules to organogenesis. K. Unsicker and K. Kriegel. New York, Wiley. **2**: 755-790.
- Paterson, B. M., Lammers, K. M., Arrieta, M. C., Fasano, A. and Meddings, J. B. (2007). "The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study." Aliment Pharmacol Ther **26**(5): 757-66.
- Perreault, N. and Beaulieu, J. F. (1998). "Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells." Exp Cell Res **245**(1): 34-42.
- Pinier, M., Verdu, E. F., Nasser-Eddine, M., David, C. S., Vezina, A., Rivard, N. and Leroux, J. C. (2009). "Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium." Gastroenterology **136**(1): 288-298.
- Plone, M. A., Petersen, J. S., Rosenbaum, D. P. and Burke, S. K. (2002). "Sevelamer, a phosphate-binding polymer, is a non-absorbed compound." Clin Pharmacokinet **41**(7): 517-23.
- Pyle, G. G., Paaso, B., Anderson, B. E., Allen, D. D., Marti, T., Li, Q., Siegel, M., Khosla, C. and Gray, G. M. (2005). "Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue." Clin Gastroenterol Hepatol **3**(7): 687-94.
- Quaroni, A. and Isselbacher, K. J. (1981). "Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures." J Natl Cancer Inst **67**(6): 1353-62.
- Ranger, M., Jones, M. C., Yessine, M. A. and Leroux, J. C. (2001). "From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization

- method to supramolecular assemblies." J Polym Sci Part A: Polym Chem **39**(22): 3861-3874.
- Robinson, K. L., Khan, M. A., de Paz Banez, M. V., Wang, X. S. and Armes, S. P. (2001). "Controlled polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate by ATRP at ambient temperature." Macromolecules **34**(10): 3155-3158.
- Ryder, N. S. (2010). "Discontinued drugs in 2008: anti-infectives." Expert Opin Investig Drugs **19**(1): 1-21.
- Salvati, V. M., Mazzarella, G., Gianfrani, C., Levings, M. K., Stefanile, R., De Giulio, B., Iaquinto, G., Giardullo, N., Auricchio, S., Roncarolo, M. G. and Troncone, R. (2005). "Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa." Gut **54**(1): 46-53.
- Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A. and Zucco, F. (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biol Toxicol **21**(1): 1-26.
- Senger, S., Luongo, D., Maurano, F., Mazzeo, M. F., Siciliano, R. A., Gianfrani, C., David, C., Troncone, R., Auricchio, S. and Rossi, M. (2003). "Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice." Immunol Lett **88**(2): 127-34.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M. and Khosla, C. (2002). "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue." Science **297**(5590): 2275-9.
- Stepniak, D., Spaenij-Dekking, L., Mitea, C., Moester, M., de Ru, A., Baak-Pablo, R., van Veelen, P., Edens, L. and Koning, F. (2006). "Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease." Am J Physiol Gastroint Liver Physiol **291**(4): G.621-629.
- Taga, K., Mostowski, H. and Tosato, G. (1993). "Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth." Blood **81**(11): 2964-71.
- Tavelin, S., Hashimoto, K., Malkinson, J., Lazorova, L., Toth, I. and Artursson, P. (2003). "A new principle for tight junction modulation based on occludin peptides." Mol Pharmacol **64**(6): 1530-40.
- Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Dromey, J. A., Beissbarth, T., van Heel, D. A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S. I., Gianfrani, C., Jewell, D. P., Hill, A. V., McCluskey, J., Rossjohn, J. and Anderson, R. P. (2010). "Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease." Sci Transl Med **2**(41): 41ra51.

- Vader, L. W., Stepniak, D. T., Bunnik, E. M., Kooy, Y. M., de Haan, W., Drijfhout, J. W., Van Veelen, P. A. and Koning, F. (2003). "Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains." Gastroenterology **125**(4): 1105-13.
- Thomas, K. E., Sapone, A., Fasano, A. and Vogel, S. N. (2006). "Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease." J Immunol **176**(4): 2512-21.
- Tsarevsky, N. V. and Matyjaszewski, K. (2007). "'Green' Atom transfer radical polymerization: from process design to preparation of well-defined environmentally friendly polymeric materials." Chem Rev **107**(6): 2270-2299.
- Tsarevsky, N. V., Pintauer, T. and Matyjaszewski, K. (2004). "Deactivation efficiency and degree of control over polymerization in ATRP in protic solvents." Macromolecules **37**(26): 9768-9778.
- Verdu, E. F., Huang, X., Natividad, J., Lu, J., Blennerhassett, P. A., David, C. S., McKay, D. M. and Murray, J. A. (2008). "Gliadin-dependent neuromuscular and epithelial secretory responses in gluten-sensitive HLA-DQ8 transgenic mice." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(1): G217-25.
- Wang, X. S., Jackson, R. A. and Armes, S. P. (2000). "Facile synthesis of acidic copolymers via atom transfer radical polymerization in aqueous media at ambient temperature." Macromolecules **33**(2): 255-257.
- Wichterle, O. and Lim, D. (1960). "Hydrophilic gels for biological use." Nature **185**(4706): 117-118.

## Annexe 1. Synthèse de l'amorceur

La synthèse des polymères linéaires (P(HEMA-*co*-SS) et PSS)) a été réalisée par polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome à partir d'un amorceur bifonctionnel. Ce macro-amorceur, le poly(éthylèneglycol) (PEG)-dibromé a été préparé, purifié et caractérisé, avant la synthèse des polymères proprement dite.

Un PEG de 2000 Da, 44 unités de répétition d'oxyde d'éthylène, a été fonctionnalisé à ses deux extrémités hydroxyles (OH) par du bromure 2-bromoisobutyryle en présence de triéthylamine (TEA) en milieu organique (tétrahydrofurane, THF) (Ranger *et al.* 2001). Après 48 h de réaction, le di(2-bromo-2-méthylpropionate)PEG a été purifié par filtration/concentration successives afin d'éliminer les sels de triéthylammonium. Ensuite, la solution organique a été versée dans de l'éther éthylique à froid afin de précipiter le di(2-bromo-2-méthylpropionate)PEG. Le précipité a été filtré. Le cycle précipitation/filtration a été répété 3 fois jusqu'à l'obtention d'un composé blanc crème. Le composé a été ensuite séché à l'étude à pression réduite avant analyse. Les caractérisations ont été effectuées par spectroscopie RMN-<sup>1</sup>H et chromatographie par exclusion stérique.

Ranger, M., Jones, M. C., Yessine, M. A. and Leroux, J. C. (2001). "From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies." J Polymer Sci Polymer Chemistry Ed 39(22): 3861-3874.

## **Annexe 2. Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome**

Les polymères avec des compositions variant en HEMA et SS ont été synthétisés à partir de l'amorceur fonctionnalisé, le di(2-bromo-2-methylpropionate)PEG ( $5 \times 10^{-2}$  mol/L), en présence de SS (de  $6 \times 10^{-2}$  à 0.6 mol/L) et de HEMA (jusqu'à 0.5 mol/L) dans une solution méthanol/eau (1:3). La solution a été dégazée sous un flux d'argon durant 15 min afin de rendre l'atmosphère inerte. Puis une solution, de complexe catalyseur de 2-2'dipyridyl et de Cu(I)Br a été ajoutée à des concentrations finales de  $5 \times 10^{-3}$  mol/L et  $11.5 \times 10^{-3}$  mol/L, respectivement. Cette solution a été préalablement dégazée. L'ensemble a été maintenu sous atmosphère inerte, à température ambiante et sous agitation durant 24 h. La purification a été conduite, dans un premier temps, par filtration sur silice en utilisant l'eau déminéralisée comme solvant. Cette étape a permis d'ôter le complexe catalyseur. Dans un second temps, une dialyse dans l'eau déminéralisée a été effectuée durant au minimum 48 h, afin d'éliminer les monomères résiduels. Les polymères ont été ensuite lyophilisés avant d'être analysés.

Cette procédure a ensuite été optimisée, au moment de la synthèse des lots de tailles importantes, requis pour les études *in vivo*. Une étape a été supprimée. Les monomères ainsi que les catalyseurs ont été mis ensemble en solution méthanol/eau (1:3). La solution a été dégazée par un flux d'argon durant 15 min, puis la réaction a été maintenue à température ambiante sous atmosphère inerte. Les polymères obtenus étaient conformes à ce qui aurait été attendu avec la procédure précédente (*i.e.* composition et masse molaire). Cette modification a permis de réduire le temps de synthèse des polymères.



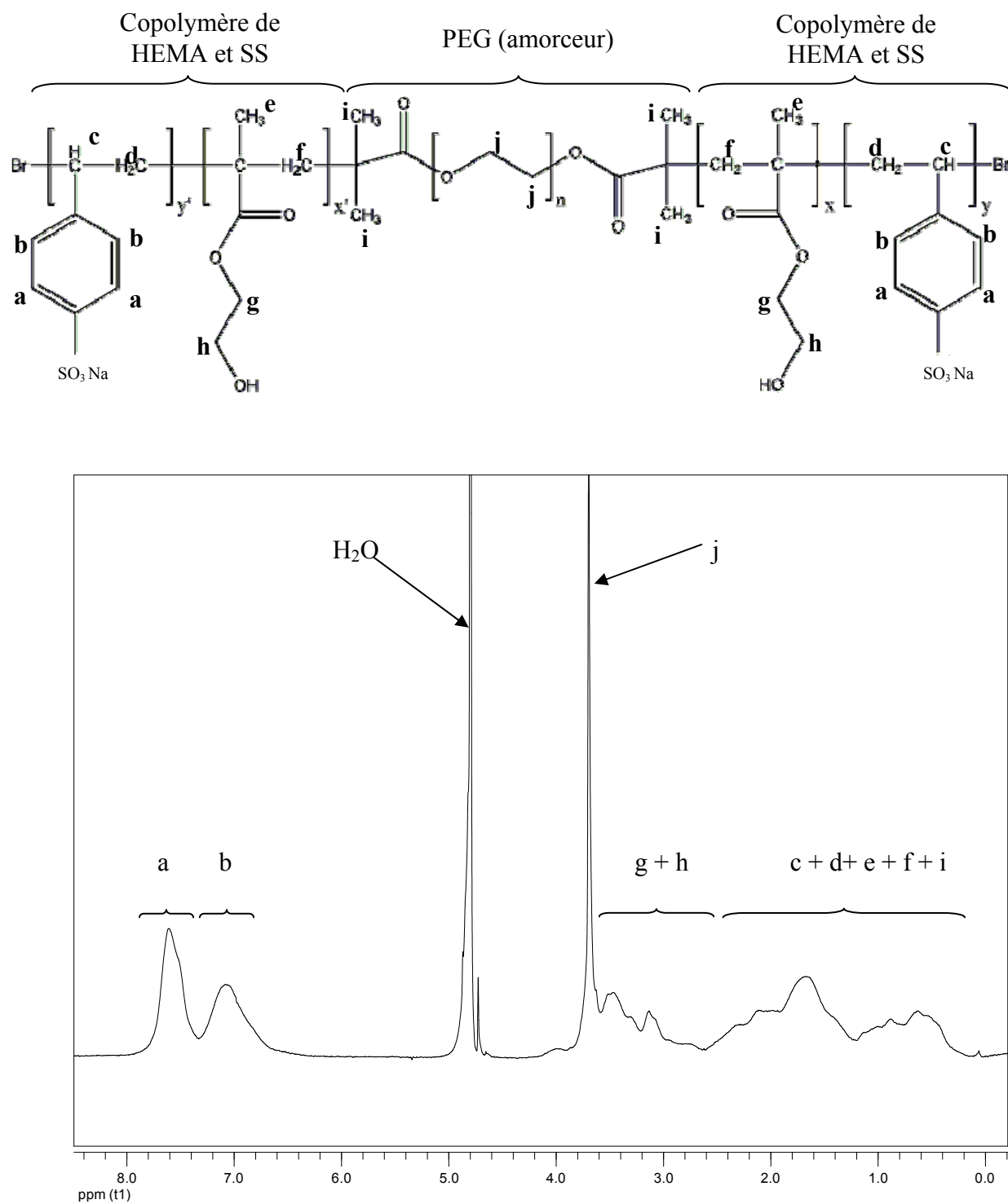


Figure A.1. Structure du P(HEMA-*co*-SS) et exemple d'analyse par RMN- $^1\text{H}$  (lot MP100806).

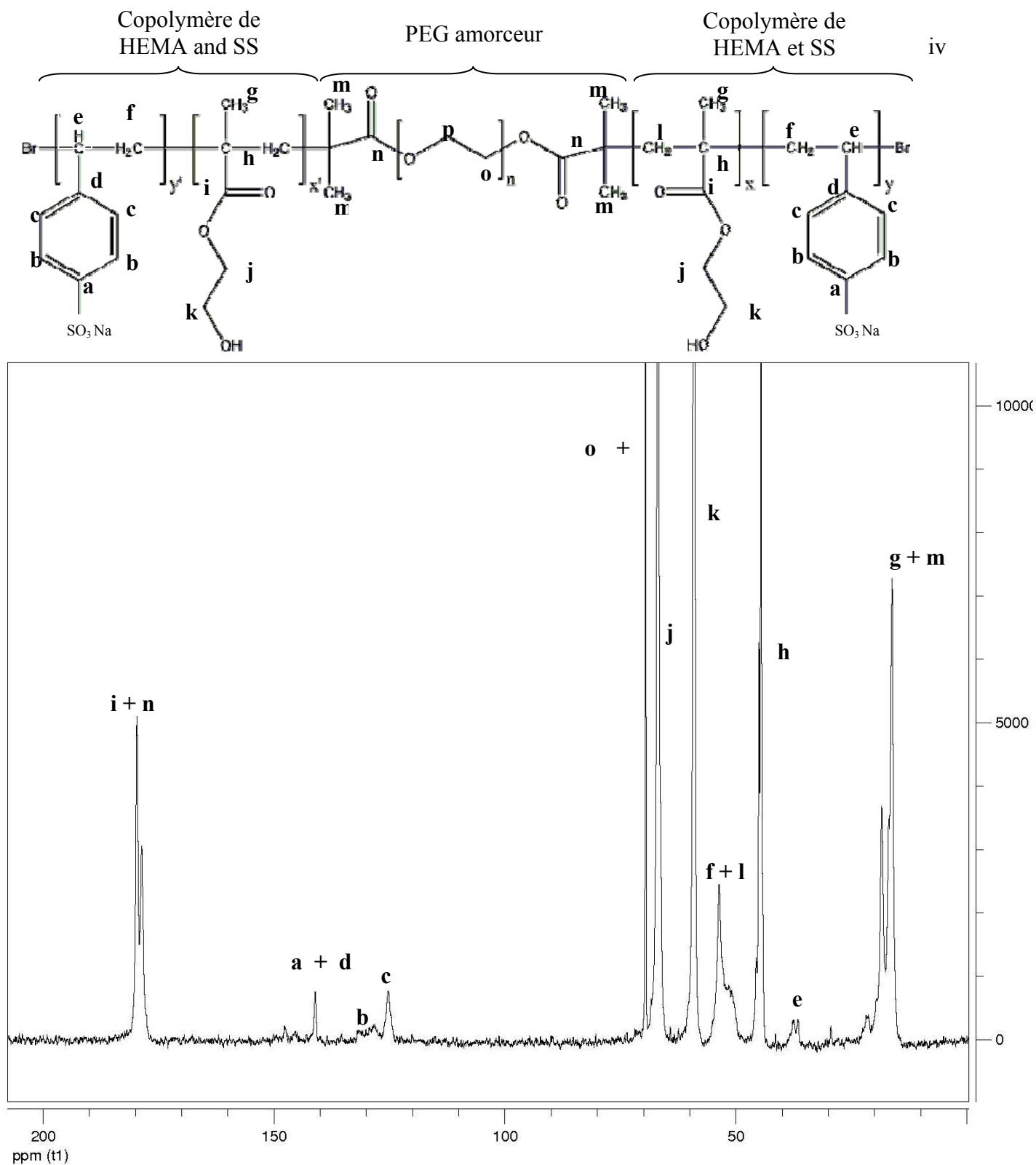


Figure A.2. Structure du P(HEMA-*co*-SS) et exemple d'analyse par RMN-<sup>13</sup>C (lot MP190506-3)

### **Annexe 3. Étude de la complexation de la gliadine**

L' $\alpha$ -gliadine a été incubée avec les différents polymères (*i.e.* pourcentage de SS entre 9 et 100% et masse molaire variante), à 37°C durant 2 h, à pH 1.2 (50 mM KCl et 85 mM HCl) et à pH 6.8 (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 2 mM NaOH). Le pourcentage de complexation a été déterminé après centrifugation à 16 000 g durant 30 min. Cette étape visait à séparer les complexes insolubles et l' $\alpha$ -gliadine libre. Cette dernière contenue dans le surnageant a été analysée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (15%) coloré par le bleu de Coomassie. La quantification a été effectuée par densitométrie optique et la complexation était calculée par comparaison avec un contrôle sans polymère.

## Annexe 4. Étude de perméabilité au mannitol

La gliadine provenait de Sigma-Aldrich (St Louis, Mo). Albumine de sérum bovin provenait de Serological Proteins (Kankakee, IL). La lignée cellulaire de Caco-2/15 était un don du Dr Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). Le “Dulbecco’s modified Eagle medium” (DMEM), l’albumine de fœtus bovin (FBS), la pénicilline 10 000 U/mL, la streptomycine 10 000 µg/mL, trypsine/EDTA, et l’HEPES provenaient de Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Le  $^3\text{[H]}$ -mannitol ainsi que le liquide à scintillation Ultima gold<sup>®</sup> provenait de Perkin Elmers. Les filtres de polycarbonate pour 12 puits Transwell<sup>®</sup> provenaient de Corning (Acton, MA).

La culture de routine des Caco-2/15 a été réalisée comme au chapitre 2. Les cellules (passage 27 et 29) ont étéensemencées sur des Transwells<sup>®</sup> à  $2,5 \times 10^4$  cellules/mL. L’expérience a débuté 15 jours après l’atteinte de la confluence afin de permettre la différenciation cellulaire

Des solutions d’albumine, de P(HEMA-co-SS) et de gliadine ont été préparées dans du milieu de culture contenant du  $^3\text{[H]}$ -mannitol. Les solutions de stimulation étaient ajoutées sur la face apicale ( $V_{\text{total}} = 500 \mu\text{L}$ ) des cellules ( $^3\text{[H]}$ -Mannitol  $0,3 \mu\text{Ci/puits}$ ). A des temps prédéfinis (15, 30, 60 180 min et 20h), 2 fois  $150 \mu\text{L}$  de milieu basal ( $V_{\text{total}} = 1500 \mu\text{L}$ ) ont été prélevés puis mélangés à 5 mL de liquide à scintillation. Le mélange a été compté par un compteur de radioactivité.

(NB : En complément, afin de s’assurer que les effets observés n’étaient pas reliés à une mort cellulaire, un test au bleu trypan sur des cellules stimulées dans les mêmes conditions sur des Caco-2/15 a été effectué. Ce test a révélé un taux de mortalité comparable dans les différents groupes ( $\sim 12\%$ )).

## Annexe 5. Étude de la déstabilisation membranaire

Les liposomes de DMPC/chol (7:3 mol/mol) ont été produits par la méthode d'évaporation-réhydratation suivie d'une extrusion sur membrane de polycarbonate. Le DMPC et le cholestérol ont été obtenus de Nothern Lipids.

Les lipides ont été dissouts dans du chloroforme, puis le mélange a été placé sur un évaporateur rotatif sous vide ( $\sim 0,1$  mBar) afin d'obtenir une fine couche lipidique homogène par évaporation du solvant. Le film lipidique a été ensuite hydraté durant la nuit à 4°C dans un tampon of *N*-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-*N*-[acide 2-éthanesulfonique] (HEPES) 20 mM (pH 7.2).

Le mélange a ensuite été agité avant d'être extrudé à plusieurs reprises sur des membranes de polycarbonate (400, 200, 100 nm) à l'aide d'un extrudeur LiposoFast (Avestin, Ottawa, ON, Canada) jusqu'à obtenir des vésicules de taille d'environ 180 nm (183,2 nm indice de polydispersité = 0,137). La taille des liposomes a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière (Malvern Autosizer 4800, Worcestershire, UK). Ces vésicules ont été incubées avec des solutions de PSS ou de P(HEMA-*co*-SS). La taille des liposomes a été mesurée à 1 et 30 min après l'ajout des liposomes. L'expérience s'est déroulée à température ambiante.

## **Annexe 6. Contributions à la revue de littérature et aux articles scientifiques**

La revue de littérature intitulée «Prevention measures and exploratory pharmacological treatments for celiac disease» a été rédigée à contribution égale de Gregor Furhmann et moi-même sous la direction de Prof. Leroux et de Prof. Verdu.

Les synthèses et les essais de complexation de l'article intitulée «Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium» ont été réalisés par mes soins, grâce à l'enseignement des techniques par Mohamad Nasser-Eddine. Les expériences cellulaires ont été exécutées par mes soins grâce à l'enseignement d'Anne Vezina et son grand support technique pour l'obtention des PCDE et des lames de Caco-2/15 en coupe transverse. Les expériences réalisées sur les souris HLA-HCD4/DQ8 ont été accomplies par Jennifer Jury et Xianxi Huang avec mon assistance. L'expérience de digestion de la gliadine ainsi que l'expérience de toxicité *in vivo* ont été exécutées par mes soins.

Les synthèses pour le manuscrit « Gluten binders exhibit a therapeutic benefits in gliadin-sensitive mice and in human tissues » ont été réalisées par mes soins. Les expériences de digestion de la gliadine et du gluten ont été réalisées par mes soins puis l'analyse par LC/MS a été accomplie par Gregor Furhmann. Les expériences réalisées sur les souris HLA-HCD4/DQ8 ont été exécutées par Jennifer Jury et Xianxi Huang avec mon assistance notamment pour l'extraction des lymphocytes. J'ai effectué l'analyse de la biodistribution sur ces souris. Les expériences de biodistribution sur les rats sains ont été réalisées par mes soins grâce à l'aide de Francois Plourde pour les prélèvements sanguins. Les expériences sur les biopsies ont été exécutées par Hana Drasarova sous la direction de Prof. Tuckova.